

**КАЗАНСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**  
**ИНСТИТУТ ФИЗИКИ**  
*Кафедра радиоэлектроники*

**А.И. ЕВСТИФЕЕВ, Н.В. КОТОВ**

**МОЛЕКУЛЫ С ЦЕНТРАМИ СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДА В КОНТУРАХ**  
**УПРАВЛЕНИЯ АКТИВНОСТЬЮ КЛЕТОЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ**

**Учебно-методическое пособие**

**Казань – 2015**

УДК 577.32  
ББК

*Принято на заседании кафедры радиоэлектроники  
Протокол № 6 от 14 мая 2015 года*

**Рецензент:**

доктор физико-математических наук,  
проф., зав. лаб. биофизики транспортных процессов КНЦ РАН

**Анисимов А.И.**

**Евстифеев А.И.**

**Молекулы с *n* центрами связывания лиганда в контурах управления активностью клеточных элементов / А.И. Евстифеев, Н.В. Котов. – Казань: Казан. ун-т, 2015. – 62 с.**

В работе приведены сведения об особенностях управления активностью ионных каналов, ферментов молекулами с *n* центрами связывания лиганда. Учебно-методическое пособие предназначено для бакалавров и магистрантов, обучающихся по направлению радиофизика, физика.

© Евстифеев А.И., 2015

© Казанский университет, 2015

## Содержание

ВВЕДЕНИЕ .....	4
Свойства молекул с $n$ центрами связывания лиганда .....	4
1. Молекула с $n$ независимыми центрами связывания .....	5
2. Вариант, когда концентрация лиганда $U_0$ намного больше общей концентрации $L_0$ молекулы $L$ .....	7
3. Молекула $L$ с 4 одинаковыми независимыми центрами связывания .....	17
4. Молекула с 4 центрами связывания, у которой все равновесные константы диссоциации ( $K_1, K_2, K_3, K_4$ ), и константы скорости диссоциации ( $K_1^-, K_2^-, K_3^-, K_4^-$ ) реакции комплексообразования различаются .....	21
5. Попарная кооперативность между центрами связывания .....	25
6. Присутствие конкурирующего лиганда .....	29
7. Вариант, когда сохраняется только общая концентрация лиганда .....	34
8. Управление молекулой с $n$ независимыми центрами связывания лиганда активностью различных белков .....	43
9. Молекула с $n$ центрами последовательного связывания лиганда .....	51
10. Механизм связывания лиганда, который описывается формулой Хилла .....	54
Список литературы .....	59
Задание .....	60

## ВВЕДЕНИЕ

В клетке существует большое количество различных элементов, активность которых управляется молекулами с несколькими центрами связывания лиганда. Например, активность многих кальций зависимых ферментов управляется белками с несколькими центрами связывания кальция [3, 4], проводимость целого ряда ионных каналов управляется рецепторами с несколькими центрами связывания медиатора и т.д.

Возможны несколько различных механизмов связывания лиганда молекулой, имеющей  $n$  центров связывания [5]:

- 1) молекулы с произвольным доступом центров связывания для лигандов.

У этого механизма возможны два варианта:

- a)  $n$  независимых центров связывания лиганда,
- b) наличие кооперативности между центрами связывания.

- 2) молекулы с последовательным механизмом связывания лигандов.

- 3) механизм связывания лигандов, который описывается формулой Хилла.

### Свойства молекул с $n$ центрами связывания лиганда

Рассмотрим молекулы, у которых  $n$  центров связывания лиганда с произвольным доступом. У таких молекул могут быть два варианта связывания лиганда.

- 1) Все  $n$  центров связывают лиганд независимо друг от друга.
- 2) Между центрами связывания есть кооперативность, которая приводит к изменению констант скоростей ассоциации и диссоциации одних центров после связывания лигандов другими центрами.

Рассмотрим эти варианты по отдельности.

## 1. Молекула с $n$ независимыми центрами связывания

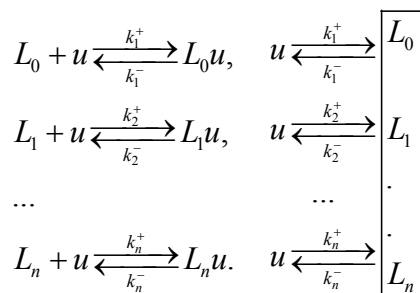


Рис. 1.1. Схема связывания лиганда, молекулой с  $n$  независимыми центрами связывания.  $k_i^+$  — константы скорости ассоциации,  $k_i^-$  — константы скорости диссоциации

Кинетическую схему связывания лиганда такой молекулой можно представить в следующем виде (рис. 1.1).

В этом случае в зависимости от того, сколько лигандов связалось с молекулой и какие конкретно места они на этой молекуле заняли, образуется  $M$  молекулярных форм этой молекулы:

$$M = \sum_{i=0}^n \frac{n!}{i!(n-i)!} \quad (1.1)$$

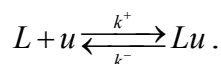
Обозначим различные молекулярные формы  $L^{(j)}$ ,  $j = 0, 1, \dots, M-1$ .  $L^{(0)}$  молекулярная форма без связанных молекул лиганда,  $L^{(1)} - L^{(n+1)}$  —  $n$  молекулярных форм с одним связанным лигандом и т.д. **Вообще говоря, можно предполагать, что каждая молекулярная форма может обладать физиологической активностью.**

Пусть  $L_0$  — общая концентрация связывающих лиганд молекул, в дальнейшем их будем называть молекулами  $L$ ,  $u$  — концентрация лиганда,  $t$  — время,  $p_i^1(u, t)$  вероятность того, что  $i$  центр занят лигандом, а  $p_i^0(u, t)$  вероятность того, что  $i$  центр свободен. Поскольку центры связывания независимы в совокупности, то концентрация любой из  $M$  молекулярных форм может быть записана в следующем виде:

$$\begin{aligned}
L^{(j)}(u, t) &= L0 \cdot \prod_{i=1}^n p_i^{c_i}(u, t), \\
L^{(j)}(u) &= L0 \cdot \prod_{i=1}^n p_i^{c_i}(u).
\end{aligned}
\tag{1.2}$$

где индекс  $c_i = 1$ , если  $i$  центр занят лигандом,  $c_i = 0$ , если  $i$  центр свободен.

Начнем анализ свойств таких молекул с рассмотрения молекулы с одним центром связывания лиганда:



Для этого случая можно записать следующие уравнения:

$$\begin{aligned}
\frac{dL(u, t)}{dt} &= -k^+ \cdot L(u, t) \cdot u(t) + k^- \cdot uL(u, t), \\
\frac{duL(u, t)}{dt} &= k^+ \cdot L(u, t) \cdot u(t) - k^- \cdot uL(u, t), \\
L(u, t) + uL(u, t) &= L0.
\end{aligned}
\tag{1.3}$$

Обозначим через  $U0$  общую концентрацию лиганда. В общем случае концентрация лиганда  $u(t)$  может иметь сложную зависимость от времени. Рассмотрим два варианта этой зависимости. В первом случае будем полагать, что концентрация лиганда намного больше общей концентрации связывающей молекулы  $U0 \gg L0$ . В этом случае можно полагать, что связывание лиганда с молекулой  $L$  не приводит к значимым изменениям концентрации лиганда. Пусть в этом случае  $u(t) = const$  или изменяется ступенькой от одного значения  $u_0 = const$  к другому  $u_1 = const$  в момент времени  $t = 0$ . Например, этот вариант реализуется, когда регистрируются мембранные токи клетки, находящейся в проточном растворе, при аппликации медиатора на клетку из пипетки. В этом случае связывание медиатора с рецептором не может существенно повлиять на концентрацию лиганда.

Второй вариант  $U0 \approx L0$ . В этом случае сохраняется только общая концентрация лиганда  $U0 = const$  или ступенькой от  $U0_0$  к  $U0_1$  изменяется во времени в момент  $t = 0$ . Этот вариант реализуется в методе смешанных струй. В этом слу-

чае концентрация свободного лиганда  $u(t)$  будет зависеть от времени. Рассмотрим эти варианты по отдельности.

## 2. Вариант, когда концентрация лиганда $U_0$ намного больше общей концентрации $L_0$ молекулы $L$

В этом случае  $u(t) = \text{const}$  или изменяется ступенькой от  $u_0$  к  $u_1$  в момент  $t = 0$ , как это представлено на рис. 2.1.

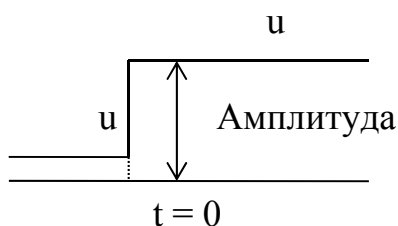


Рис. 2.1. Ступенчатое изменение концентрации лиганда

Тогда система уравнений (1.3) линейна. Решая их, получим выражения для концентраций молекул, связавших лиганд ( $uL$ ), и свободных ( $L$ ) при скачке концентрации лиганда  $u_0$  к  $u_1$  в момент времени  $t = 0$ .

$$\begin{aligned}
 L(u) &= L_0 \cdot \frac{K}{K + u}, \\
 uL(u) &= L_0 \cdot \frac{u}{K + u}, \\
 L(u, t) &= L_0 \cdot \left( \frac{K}{K + u_1} - \left( \frac{K}{K + u_1} - \frac{K}{K + u_0} \right) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right), \\
 uL(u, t) &= L_0 \cdot \left( \frac{u_1}{K + u_1} - \left( \frac{u_1}{K + u_1} - \frac{u_0}{K + u_0} \right) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right), \\
 \tau(u_1) &= \frac{K}{k^- \cdot (u_1 + K)},
 \end{aligned} \tag{2.1}$$

где  $K = k^- / k^+$ .

Сопоставляя выражения (2.1) с (1.2), получим выражения для вероятностей того, что центр занят лигандом или свободен. При скачке концентрации лиганда от  $u_0$  к  $u_1$  (при  $u_1 \gg L_0$ ) эти выражения будут:

$$\begin{aligned}
L^{(1)}(t) &= L0 \cdot p^0(u, t), \\
L^{(2)}(t) &= L0 \cdot p^1(u, t), \\
p^0(u, t) &= p^0(u_1) - (p^0(u_1) - p^0(u_0)) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right), \\
p^1(u, t) &= p^1(u_1) - (p^1(u_1) - p^1(u_0)) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right),
\end{aligned} \tag{2.2}$$

$$\begin{aligned}
p^0(u) &= \frac{K}{K + u}, \\
p^1(u) &= \frac{u}{K + u}, \\
\tau &= \frac{K}{k^- \cdot (u_1 + K)},
\end{aligned}$$

где  $K = k^- / k^+$ ,  $p^0(u)$ ,  $p^1(u)$  — стационарные вероятности того, что центр свободен или занят лигандом при концентрации лиганда  $u$ .

В любой момент времени выполняется условие сохранения общего количества молекул  $L$ ,

$$L^{(0)}(t) + L^{(1)}(t) = L0$$

и соответственно для суммы вероятностей в любой момент времени выполняется

$$p^0(u) + p^1(u) = 1, \quad p^0(u, t) + p^1(u, t) = 1.$$

Тогда для молекулы, имеющей  $n$  независимых центров связывания лиганда, с разными константами скоростей ассоциации и диссоциации при скачке концентрации лиганда от  $u_0$  к  $u_1$  в момент времени  $t = 0$  получим следующие выражения для динамики концентрации молекулярных форм  $L^{(j)}(u, t)$ :



$$\begin{aligned}
L^{(j)}(u, t) &= L0 \cdot \prod_{i=1}^n p_i^{c_i}(u, t), \\
p_i^0(u) &= \frac{K_i}{K_i + u}, \\
p_i^1(u) &= \frac{u}{K_i + u}, \\
p_i^0(u, t) &= p_i^0(u_1) - (p_i^0(u_1) - p_i^0(u_0)) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right), \\
p_i^1(u, t) &= p_i^1(u_1) - (p_i^1(u_1) - p_i^1(u_0)) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right), \\
\tau_i(u_1) &= \frac{K_i}{k_i^- \cdot (u_1 + K_i)},
\end{aligned} \tag{2.3}$$

где индекс  $c_i = 1$ , если  $i$  центр занят лигандом,  $c_i = 0$ , если  $i$  центр свободен.

Зависимость стационарной концентрации молекулярных форм  $L^{(j)}(u)$  от концентрации лиганда  $u$  получим из (2.3) при  $t \rightarrow \infty$ .

$$L^{(j)}(u) = L0 \cdot \prod_{i=1}^n p_i^{c_i}(u), \tag{2.4}$$

индекс  $c_i = 1$ , если  $i$  центр занят лигандом,  $c_i = 0$ , если  $i$  центр свободен.

Обозначим  $Ls(t)$  количество лиганда, связанного с молекулами  $L$ . Молекула с  $n$  независимыми центрами связывания при скачке концентрации лиганда от  $u_0$  к  $u_1$  (при  $u_1 \gg L0$ ) будет связывать лиганд с кинетикой:

$$Ls(u, t) = \sum_{j=2}^{n+2} L^{(j)}(u, t) + \sum_{j=n+3}^{C_n^2 + n+3} 2 \cdot L^{(j)}(u, t) + \dots + n \cdot L^{(M)}(u, t). \tag{2.5}$$

Поскольку все центры связывания независимы, стационарную зависимость количества связанного молекулой лиганда  $Ls(u)$  от его концентрации  $u$  можно представить следующей формулой:

$$Ls(u) = L0 \cdot \sum_{i=1}^n \frac{u}{K_i + u}. \tag{2.6}$$

Рассмотрим свойства молекулы, имеющей  $n$  одинаковых независимых центров связывания с равновесной константой диссоциации  $K = k^- / k^+$  и кон-

Таблица 2.1

Значения концентрации лиганда, при которых молекулярные моды, достигают максимальных значений.

n	$\log\left(\frac{u_1^{\max}}{K}\right)$	$\log\left(\frac{u_2^{\max}}{K}\right)$	$\log\left(\frac{u_3^{\max}}{K}\right)$	$\log\left(\frac{u_4^{\max}}{K}\right)$	$\log\left(\frac{u_5^{\max}}{K}\right)$
2	0	-	-	-	-
3	-0.301	0.301	-	-	-
4	-0.477	0	0.477	-	-
5	-0.602	-0.176	0.176	0.602	-
6	-0.600	0.301	0	0.301	0.600

стантой скорости диссоциации  $k^-$ . Пусть  $KM_0$  общая концентрация молекул,  $KM_i$  — концентрация молекулярных форм этой молекулы и  $u$  — концентрация лиганда. Молекулярных форм будет  $M$  (формула 1.1), но поскольку константы для всех центров связывания одинаковы, то молекулярные формы, связавшие по одинаковому количеству лигандов, будут описываться одинаковыми выражениями. Используя формулу (2.4) получим выражения для стационарных концентраций молекулярных форм, связавших  $i$  молекул лиганда:

$$KM_i(u) = KM_0 \cdot \frac{u^i \cdot K^{n-i}}{(K + u)^n}, \quad i = 0, 1, \dots, n. \quad (2.6)$$

В этом случае зависимости  $KM_1(u), \dots, KM_{n-1}(u)$  имеют по одному максимуму при значениях концентрации лиганда  $u_i^{\max}$ . Возьмем производную по  $u$  от формулы (2.6) и приравняем нулю. Решив это уравнение, получим:

$$u_i^{\max} = \frac{K \cdot i}{n - i}, \quad i = 1, 2, \dots, n - 1. \quad (2.7)$$

В таблице 2.1 даны значения концентрации лиганда, при которых молекулярные моды, связавшие по 1, 2, ..., n-1 молекул лиганда, достигают макси-

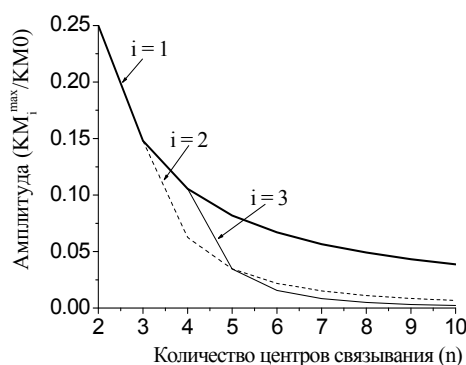


Рис. 2.2. Зависимость максимальной амплитуды  $KM_i^{\max}$  молекулярных мод, связавших  $i$  молекул лиганда, от количества центров связывания  $n$

мальных значений. Амплитуды концентраций молекулярных форм  $KM_i$  при этих значениях будут  $KM_i^{\max}$ . Подставив (2.7) в (2.6), получим:

$$KM_i^{\max} = KM_0 \cdot \frac{i^i}{n^n} (n-i)^{n-i}. \quad (2.8)$$

На рис. 2.2 представлена зависимость максимальной амплитуды  $KM_i^{\max}$  молекулярных мод, связавших  $i$  молекул лиганда, от количества центров связывания  $n$ .

Таблица 2.2  
Значения амплитуд молекулярных мод  $KM_i$ , связавших  $i$  молекул лиганда, при разном количестве центров связывания  $n$ .

$n$	$\frac{KM_1^{\max}}{KM_0}$	$\frac{KM_2^{\max}}{KM_0}$	$\frac{KM_3^{\max}}{KM_0}$	$\frac{KM_4^{\max}}{KM_0}$	$\frac{KM_5^{\max}}{KM_0}$
2	0.25	-	-	-	-
3	0.148	0.148	-	-	-
4	0.105	0.063	0.105	-	-
5	0.082	0.035	0.035	0.082	-
6	0.067	0.022	0.016	0.022	0.067

В таблице 2.2 даны значения амплитуд молекулярных мод  $KM_i$ , связавших  $i$  молекул лиганда, при разном количестве центров связывания  $n$ .

Максимальные концентрации молекулярных форм без связанных лигандов (при  $u = 0$ ) и с  $n$  связанными лигандами (при  $u \rightarrow \infty$ ) будут равны  $KM_0$ . Используя выражение (2.6), найдем значения концентрации лиганда, при которой молекулярные моды без свя-

занных лигандов ( $u_0^{0.5}$ ) и с  $n$  связанными лигандами ( $u_n^{0.5}$ ), будут достигать полумаксимальной концентрации  $0.5 \cdot KM_0$ :

$$u_0^{0.5} = K \cdot \frac{1 - \sqrt[n]{0.5}}{\sqrt[n]{0.5}},$$

$$u_n^{0.5} = K \cdot \frac{\sqrt[n]{0.5}}{1 - \sqrt[n]{0.5}} \approx K \cdot (1.44 \cdot n - 0.44). \quad (2.9)$$

Только при  $n=1$  значение концентрации лиганда при полумаксимальной активности равно равновесной константе диссоциации.

Из (2.9) находим выражение для  $n$ :

$$n = 0.693 \cdot \left( \ln \left( \frac{K + u_n^{0.5}}{u_n^{0.5}} \right) \right)^{-1} \approx 0.3 + 0.7 \cdot \frac{u_n^{0.5}}{K}. \quad (2.10)$$

На рис. 2.3. дана зависимость концентрации лиганда ( $u_0^{0.5}, u_n^{0.5}$ ), при которой достигается полумаксимальная концентрация молекулярной формы без связанных лигандов  $u_0^{0.5}$  и полумаксимальная концентрация насыщенной формы с  $n$  связанными лигандами  $u_n^{0.5}$  от количества центров связывания  $n$ .

Таблица 2.3

Логарифмическая полуширина молекулярных мод.

n	$A_1$	$A_2$	$A_3$	$A_4$	$A_5$
2	1.53	-	-	-	-
3	1.3	1.3	-	-	-
4	1.228	1.052	1.228	-	-
5	1.19	0.955	0.955	1.19	-
6	1.165	0.905	0.851	0.905	1.165

В таблице 2.3 представлена зависимость логарифмической полуширины молекулярных мод  $A_i$ , связавших  $i$  молекул лиганда при разном количестве центров связывания.

На рис. 2.4. представлена зависимость логарифмической полуширины  $A$  концентрации

молекулярной моды с одним связанным лигандом от количества центров связывания  $n$ .

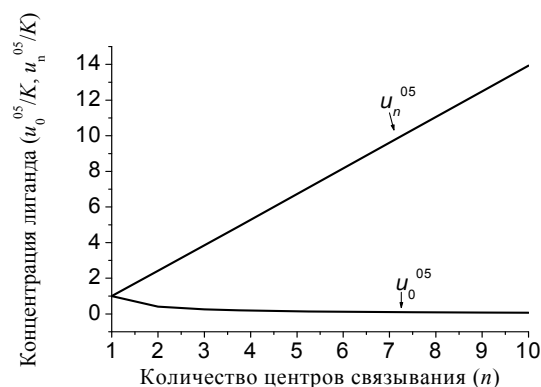


Рис. 2.3. Зависимость концентрации лиганда ( $u_0^{0.5}, u_n^{0.5}$ ), при которой достигается полумаксимальная концентрация молекулярной формы без связанных лигандов  $u_0^{0.5}$  и полумаксимальная концентрация насыщенной формы с  $n$  связанными лигандами  $u_n^{0.5}$  от количества центров связывания  $n$

На рис. 2.5 представлена зависимость логарифмической ширины  $A_n$  молекуляр-

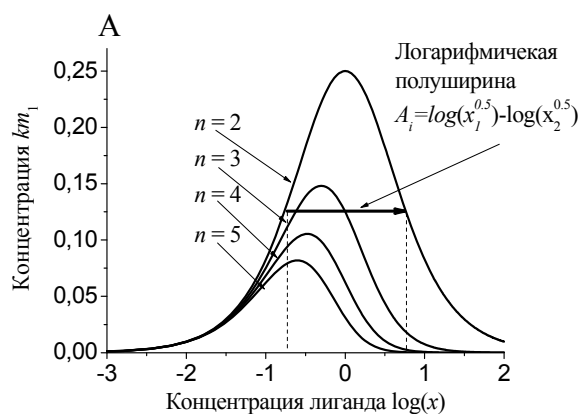


Рис. 2.4. Зависимость логарифмической полуширины  $A$  концентрации молекулярной моды с одним связанным лигандом от количества центров связывания  $n$

ной моды с  $n$  связанными лигандами от количества центров связывания  $n$ .

В таблице 2.4 представлена зависимость логарифмической ширины  $A_n = \log(u^{0.9}) - \log(u^{0.1})$  молекулярной моды  $KM_n$  от количества центров связывания  $n$ .

Используя формулу (2.6), получим выражение для общего количества связанного молекулой лиганда при значении концентрации лиганда  $u = K$ :

$$\begin{aligned} Ls(K) &= 0.5 \cdot Ls(u)^{\max}, \\ Ls(u)^{\max} &= n \cdot L0. \end{aligned} \quad (2.11).$$

Это означает, что концентрация лиганда, при которой достигается полумаксимальное насыщение молекулы лигандами, равна равновесной константе диссоциа-

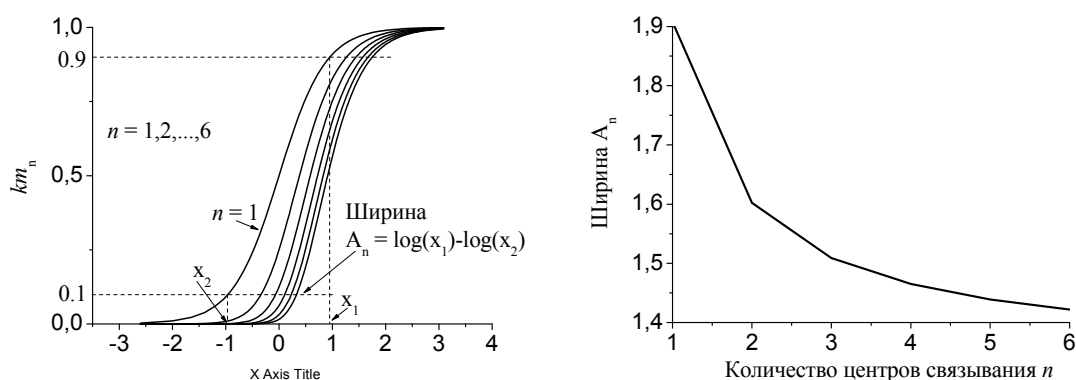


Рис. 2.5. Зависимость логарифмической ширины  $A_n$  молекулярной моды с  $n$  связанными лигандами от количества центров связывания  $n$ .

Таблица 2.4

Зависимость логарифмической ширины  $A_n$  молекулярной моды с  $n$  связанными лигандами от количества центров связывания  $n$ .

$n$	$A_n$
1	1.908
2	1.602
3	1.509
4	1.465
5	1.439
6	1.422

ции при любом количестве центров связывания у молекулы  $L$ .

На основе формул (2.3) получим выражение для динамики изменения концентрации молекулярных форм  $KM_i(u, t)$  при скачке концентрации лиганда от  $u_0$  к  $u_1$ .

$$KM_i = KM0 \cdot (p^1(u, t))^i \cdot (p^0(u, t))^{n-i},$$

$$\begin{aligned}
p^0(u, t) &= \frac{K}{(K + u_1)} - \left( \frac{K}{(K + u_1)} - \frac{K}{(K + u_0)} \right) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau(u_1)}\right), \\
p^1(u, t) &= \frac{u_1}{(K + u_1)} - \left( \frac{u_1}{(K + u_1)} - \frac{u_0}{(K + u_0)^n} \right) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau(u_1)}\right), \\
\tau(u_1) &= \left( k^- \cdot \left( \frac{u_1}{K} + 1 \right) \right)^{-1}.
\end{aligned} \tag{2.12}$$

Возьмем производную по времени от (2.12) и приравняем нулю. Решив это уравнение, получим времена ( $t_i^{\max}$ ), при которых молекулярные моды  $KM_i$ , связавшие  $i$  молекул лиганда, будут достигать своих максимальных значений  $KM_i^{\max}$ :

$$t_i^{\max} = \tau(u_1) \cdot \ln\left(\frac{n \cdot K \cdot (u_1 - u_0)}{(K + u_0) \cdot [(n - i) \cdot u_1 - i \cdot K]}\right), \quad i = 1, 2, \dots, n - 1. \tag{2.13}$$

Подставим (2.13) в (2.12) и найдем максимальные амплитуды при этих временах:

$$KM_i^{\max}(n \text{ при } t = t_i^{\max}) = KM_0 \cdot \frac{i^i}{n^n} (n - i)^{n-i}, \quad i = 1, 2, \dots, n - 1. \tag{2.14}$$

В динамике амплитудные значения молекулярных мод те же самые, что и в стационаре.

Стационарное значение концентрации молекулярной формы с 0 связанных лигандов и с  $n$  связанными лигандами будут выражаться формулой (2.6). Найдем значение времени полуспада концентрации молекулярной формы с 0 лигандов  $\tau_0^{0.5}$  и времени, при котором молекулярная мода с  $n$  связанными лигандами достигает полумаксимального значения  $\tau_n^{0.5}$  (см. пояснения на рис. 2.7):

$$\tau_n^{0.5} = \tau \cdot \ln \left[ K \cdot \frac{u_1 - u_0}{(K + u_0) \cdot \left( u_1 - (K + u_1) \cdot \left( 0.5 \cdot \left( \left( \frac{u_0}{K + u_0} \right)^n + \left( \frac{u_1}{K + u_1} \right)^n \right) \right)^{\frac{1}{n}}} \right)} \right], \quad (2.15)$$

$$\tau_0^{0.5} = \tau \cdot \ln \left[ K \cdot \frac{u_1 - u_0}{(K + u_0) \cdot \left( (K + u_1) \cdot \left( 0.5 \cdot \left( \left( \frac{K}{K + u_0} \right)^n + \left( \frac{K}{K + u_1} \right)^n \right) \right)^{\frac{1}{n}} - K \right)} \right]$$

На рис. 2.5 представлены зависимости времени полуспада  $\tau_0^{0.5}$  и времени достижения полумаксимальной концентрации  $\tau_4^{0.5}$  от амплитуды скачка концентрации лиганда  $u_1$ . Найдем для разных  $n$ , при каких значениях  $u_0$  выполняется  $\tau_n^{0.5} \approx \tau$ . На рис. 2.6А представлена динамика изменения концентрации молекулярных мод молекулы L, у которой 4 центра связывания, с 0 связанных лигандов  $km_0$  и рис. 2.6Б с  $n$  связанными лигандами. Пунктирными линиями помечены времена полуспада  $\tau_0^{0.5}$  и время достижения полумаксимальной концентрации  $\tau_4^{0.5}$ ,  $km_i = KM_i / KM_0$ ,  $\eta = k^- \cdot t$ . На рис. 2.7 представлены зависимости времени полуспада  $\tau_0^{0.5}$  (А) и времени достижения полумаксимальной концентрации  $\tau_4^{0.5}$  (Б) от амплитуды скачка концентрации лиганда  $u_1$ .

$$\lim_{u_1 \rightarrow \infty} \ln \left[ K \cdot \frac{u_1 - u_0}{(K + u_0) \cdot \left( u_1 - (K + u_1) \cdot \left( 0.5 \cdot \left( \left( \frac{u_0}{K + u_0} \right)^n + \left( \frac{u_1}{K + u_1} \right)^n \right) \right)^{\frac{1}{n}}} \right)} \right] = 1.$$



Таблица 2.5.

Значения  $u_0$  (для разных  $n$ ), при скачке концентрации от которого ( $u_0$ ) к  $u_1 \gg K$  время полудостижения максимальной концентрации равно константе скорости  $\tau_n^{0.5} \approx \tau$ .

n	2	3	4	5
$u_0 / K$	0.38	1.26	2.15	3.05

В таблице 2.5 даны значения  $u_0$  (для разных  $n$ ), при скачке концентрации от которого ( $u_0$ ) к  $u_1 \gg K$  время полудостижения максимальной концентрации равно константе скорости  $\tau_n^{0.5} \approx \tau$ .

### 3. Молекула L с 4 одинаковыми независимыми центрами связывания

Для примера рассмотрим молекулу с 4 одинаковыми независимыми центрами связывания. При  $n = 4$  образуется 16 молекулярных форм  $KM_i$ . Одна молекулярная форма без связанных молекул лиганда, 4 с одним связанным лигандом, 6 с двумя связанными лигандами, 4 с тремя связанными лигандами и одна с 4 связанными лигандами. Обозначим через  $KM_0$  общую концентрацию наших молекул. Пусть равновесные константы диссоциации будут  $K$ . Введем безразмерную концентрацию лиганда  $x = u/K$ , безразмерную концентрацию молеку-

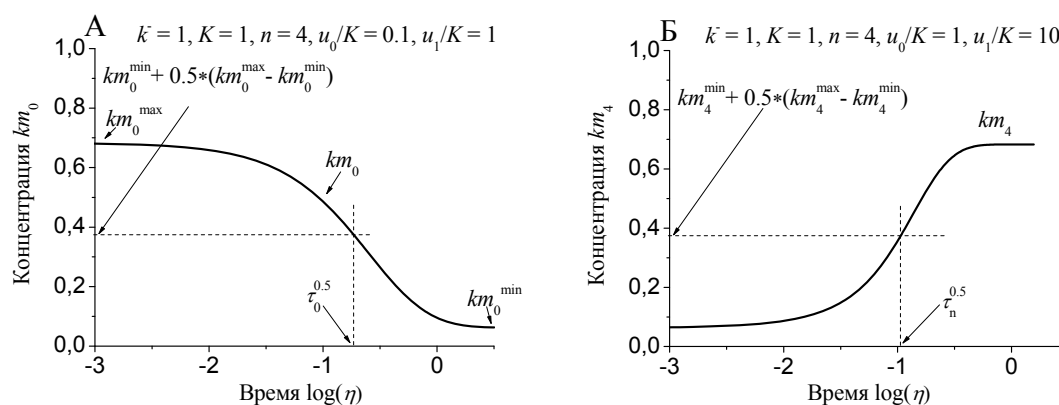


Рис. 2.6. А) динамика изменения концентрации молекулярных мод молекулы L, у которой 4 центра связывания, с 0 связанных лигандов  $km_0$  и Б) с  $n$  связанными лигандами. Пунктирными линиями помечены времена полуспада  $\tau_0^{0.5}$  и время достижения полумаксимальной концентрации  $\tau_4^{0.5}$  ..

$$km_i = KM_i / KM_0, \quad \eta = k^- \cdot t$$

лярных форм нашей молекулы  $km_i = KM_i/KM_0$  и безразмерное время

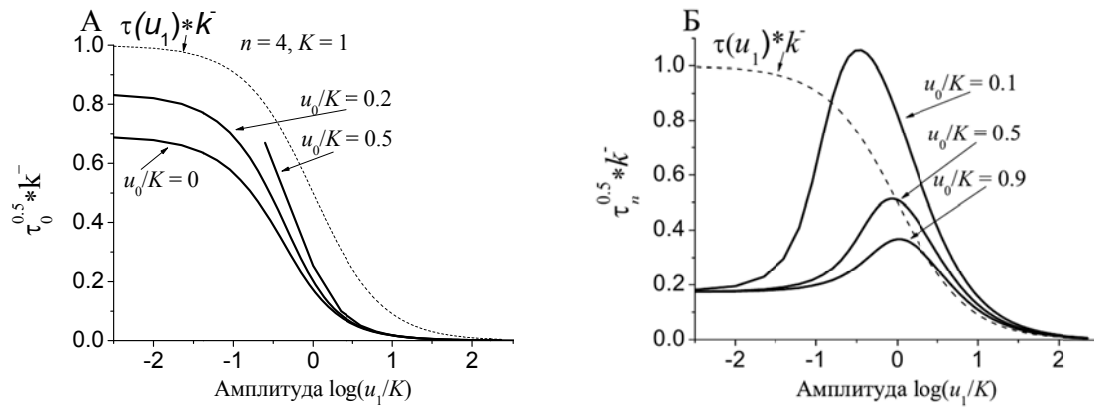


Рис. 2.7. Зависимости времени полуспада  $\tau_0^{0.5}$  (А) и времени достижения полумаксимальной концентрации  $\tau_4^{0.5}$  (Б) от амплитуды скачка концентрации лиганда  $u_1$

$\eta = t \cdot k^-$ . Тогда, используя (2.7), получим следующие выражения для стационарной концентрации различных молекулярных форм  $km_i$ :

$$km_i(x) = \frac{x^i}{(1+x)^4}, \quad (3.1)$$

где  $x = u/K$ .

На рис. 3.1 дан график зависимости концентрации различных молекуляр-

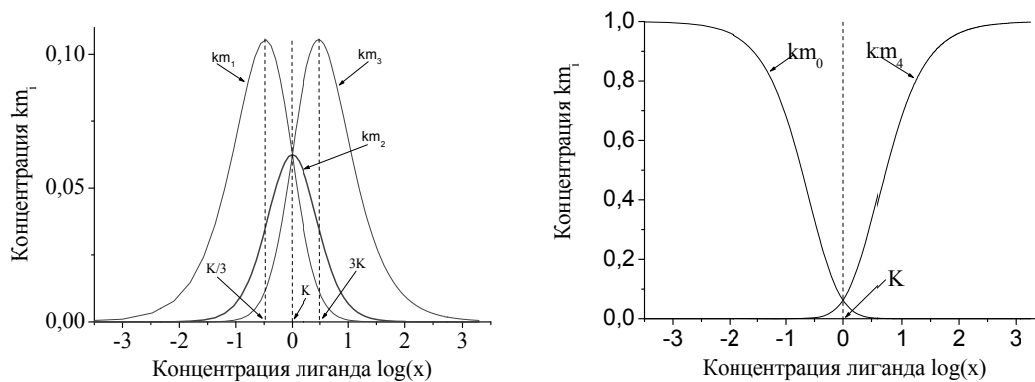


Рис. 3.1. Зависимость концентрации молекулярных форм  $km_i = KM_i/KM_0$  от концентрации лиганда  $x = u/K$  для молекулы с 4 одинаковыми независимыми центрами связывания

ных форм  $km_i$ , связавших  $i$  молекул лиганда, от концентрации лиганда  $x$ .

Используя формулу (2.12) получим выражения для динамики изменения концентрации молекулярных форм  $km_i$  при скачке концентрации лиганда от  $x_0$  к  $x_1$ :

$$km_i = \left(p^1(x, \eta)\right)^i \cdot \left(p^0(x, \eta)\right)^{4-i},$$

$$\begin{aligned} p^0(x, \eta) &= \frac{1}{(1+x_1)} - \left( \frac{1}{(1+x_1)} - \frac{1}{(1+x_0)} \right) \cdot \exp\left(-\frac{\eta}{x_1+1}\right), \\ p^1(x, \eta) &= \frac{x_1}{(1+x_1)} - \left( \frac{x_1}{(1+x_1)} - \frac{x_0}{(1+x_0)} \right) \cdot \exp\left(-\frac{\eta}{x_1+1}\right). \end{aligned} \quad (3.2)$$

Максимальные значения концентрации молекулярных форм  $km_i$  будут при концентрациях лиганда  $u_1^{max} = K / 3$ ,  $u_2^{max} = K$ ,  $u_3^{max} = 3 \cdot K$  (формула (2.7)). Амплитуды максимальных значений будут (формула (2.8))  $KM_1^{max} = KM_0 \cdot 0.105$ ,  $KM_2^{max} = KM_0 \cdot 0.063$ ,  $KM_3^{max} = KM_0 \cdot 0.105$ .

На рис. 3.2 представлена динамика изменения концентрации молекулярных форм  $km_i$  при скачке концентрации от  $x_0$  к  $x_1$ .

Продифференцируем формулы (3.2) по  $\eta$ , приравняем нулю и найдем

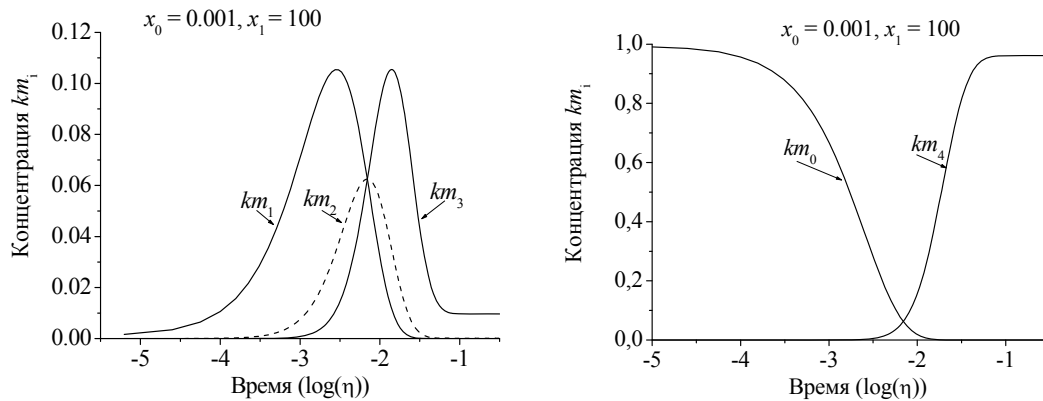


Рис. 3.2. Динамика изменения концентрации молекулярных форм  $km_i$  молекулы, имеющей 4 одинаковых независимых центра связывания лиганда, при скачке концентрации лиганда от  $x_0$  к  $x_1$ . Время  $\eta = k^- \cdot t$

время  $\eta_i^{max}$ , при котором молекулярные формы  $km_i$  достигают своих максимальных значений:

$$\begin{aligned}
\eta_1^{\max} &= \frac{1}{x_1 + 1} \ln \left( \frac{4 \cdot (x_1 - x_0)}{(1 + x_0) \cdot (3 \cdot x_1 - 1)} \right), \\
\eta_2^{\max} &= \frac{1}{x_1 + 1} \ln \left( \frac{2 \cdot (x_1 - x_0)}{(1 + x_0) \cdot (x_1 - 1)} \right), \\
\eta_3^{\max} &= \frac{1}{x_1 + 1} \ln \left( \frac{4 \cdot (x_1 - x_0)}{(1 + x_0) \cdot (x_1 - 3)} \right).
\end{aligned} \tag{3.3}$$

На рис. 3.3 представлена зависимость времени  $\eta_i^{\max}$ , когда молекулярные

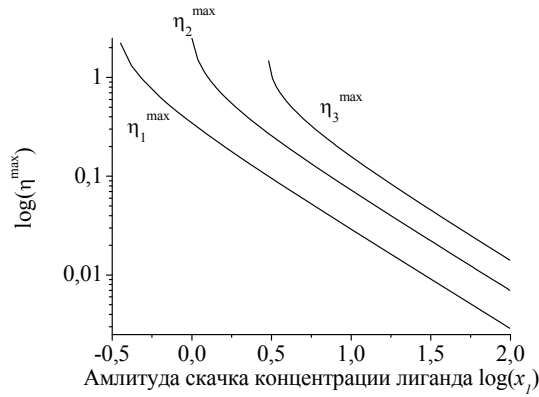


Рис. 3.3. Зависимость времени  $\eta_i^{\max}$ , когда концентрации молекулярных форм  $kt_i$  достигают максимальных значений, от амплитуды скачка концентрации лиганда  $x_1 = u_1/K$

формы достигают своих максимальных значений, от амплитуды скачка концентрации лиганда  $x_1$ .

Из формул (3.3) видно, что  $\eta_1^{\max}$  не существует при  $x_1 < 1/3$ ,  $\eta_2^{\max}$  при  $x_1 < 1$  и  $\eta_3^{\max}$  при  $x_1 < 3$ . В этих случаях концентрации молекулярных форм не проходят через максимум, а монотонно достигают своих стационарных значений.

**4. Молекула с 4 центрами связывания, у которой все равновесные константы диссоциации ( $K_1, K_2, K_3, K_4$ ), и константы скорости диссоциации ( $K_1^-, K_2^-, K_3^-, K_4^-$ ) реакции комплексообразования различаются**

Рассмотрим ту же молекулу с 4 независимыми центрами связывания, но у которой все равновесные константы диссоциации ( $K_1, K_2, K_3, K_4$ ), и константы скорости диссоциации ( $K_1^-, K_2^-, K_3^-, K_4^-$ ) реакции комплексообразования различаются. Пусть  $K_1 > K_2 > K_3 > K_4$ , а ( $K_1^- > K_2^- > K_3^- > K_4^-$ ). Введем безразмерную концентрацию  $x = u/K_1$  и безразмерные константы  $k_1 = 1$ ,  $k_2 = K_2/K_1$ ,  $k_3 = K_3/K_1$ ,  $k_4 = K_4/K_1$  и  $k_1^- = K_1^-/K_1^-$ ,  $k_2^- = K_2^-/K_1^-$ ,  $k_3^- = K_3^-/K_1^-$ ,  $k_4^- = K_4^-/K_1^-$ . На рис. 4.1 приведены зависимости стационарных концентраций 16 молекулярных форм  $km_i$  от кон-

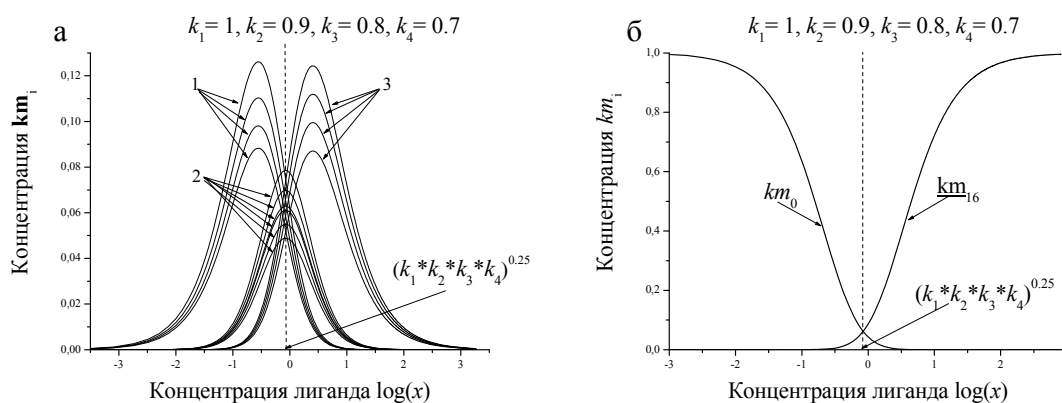


Рис. 4.1. Зависимость стационарной концентрации молекулярных форм  $km_i = KM_i/KM_0$  от концентрации лиганда  $x = u/K_1$ , когда константы реакции комплексообразования близки друг к другу  $k_1 = 1$ ,  $k_2 = 0.9$ ,  $k_3 = 0.8$ ,  $k_4 = 0.7$ . На рис. 4.1а цифрой 1 отмечены молекулярные моды с одним связанным лигандом, цифрой 2 — с двумя, цифрой 3 с тремя

центрации лиганда  $x = u/K_1$ . В этой ситуации, значения концентраций лиганда, при которых молекулярные моды, связавшие одинаковое количество лигандов достигают своих максимальных значений, очень близки друг к другу. Для молекулярных мод, связавших по одному, двум и трем лигандам в нашем конкретном случае будет:  $u_1^{max} \approx \frac{K_1 \cdot (k_1 \cdot k_2 \cdot k_3 \cdot k_4)^{0.25}}{3.5}$ ,  $u_2^{max} \approx K_1 \cdot (k_1 \cdot k_2 \cdot k_3 \cdot k_4)^{0.25}$ ,  $u_3^{max} \approx 3.8 \cdot K_1 \cdot (k_1 \cdot k_2 \cdot k_3 \cdot k_4)^{0.25}$  (рис. 4.2).

Динамика изменения концентрации молекулярных форм  $km_i$  представлена на рис. 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7.

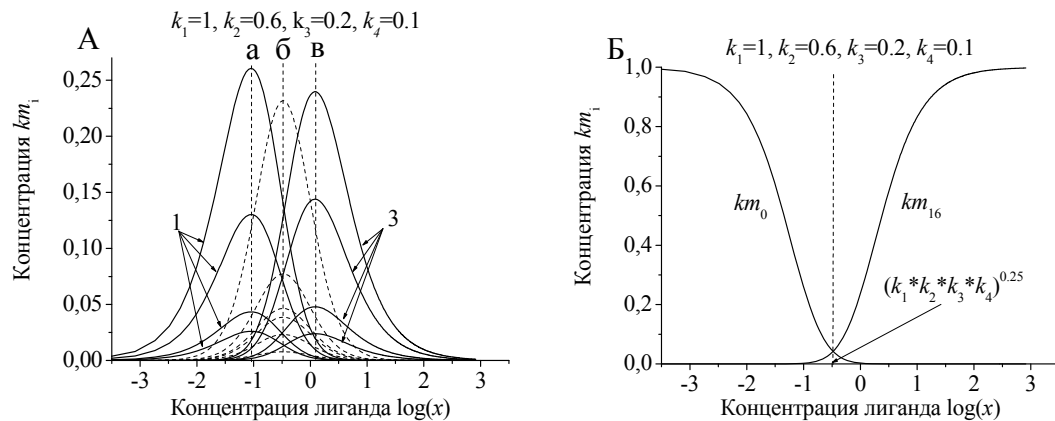


Рис. 4.2. Зависимость стационарной концентрации молекулярных форм  $km_i = KM_i/KM_0$  от концентрации лиганда  $x = u/K_1$ , когда константы реакции комплексообразования различаются на порядок  $k_1 = 1, k_2 = 0.6, k_3 = 0.2, k_4 = 0.1$ . Цифрой 1 помечены молекулярные моды с одним связанным лигандом, цифрой 3 — с тремя. Пунктирными линиями помечены молекулярные моды с двумя связанными лигандами. Вертикальными пунктирными линиями (а, б, в) помечены положения максимумов молекулярных мод с одним связанным лигандом, с двумя, с тремя соответственно

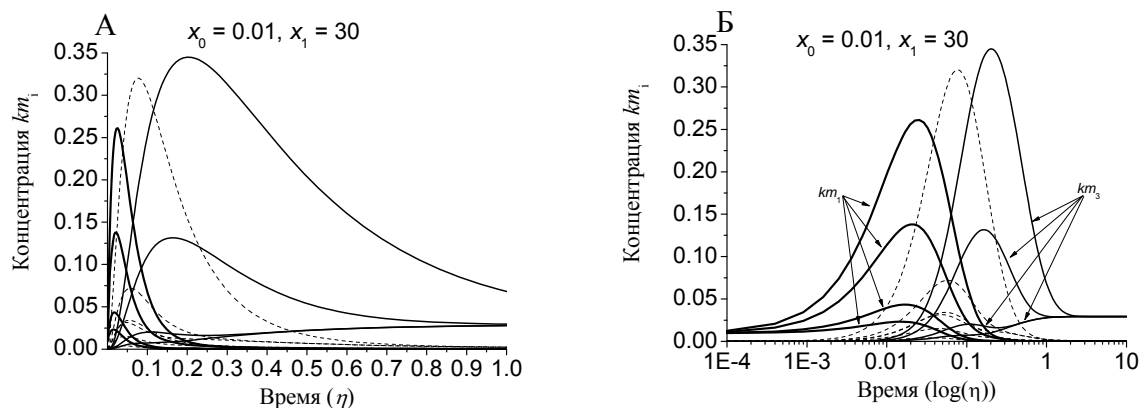


Рис. 4.3. Динамика изменения концентрации молекулярных мод  $km_i$  при скачке концентрации лиганда от  $x_0$  к  $x_1$ .  $\eta = k^- \cdot t$ . А) линейная развертка по времени. Б) логарифмическая развертка по времени

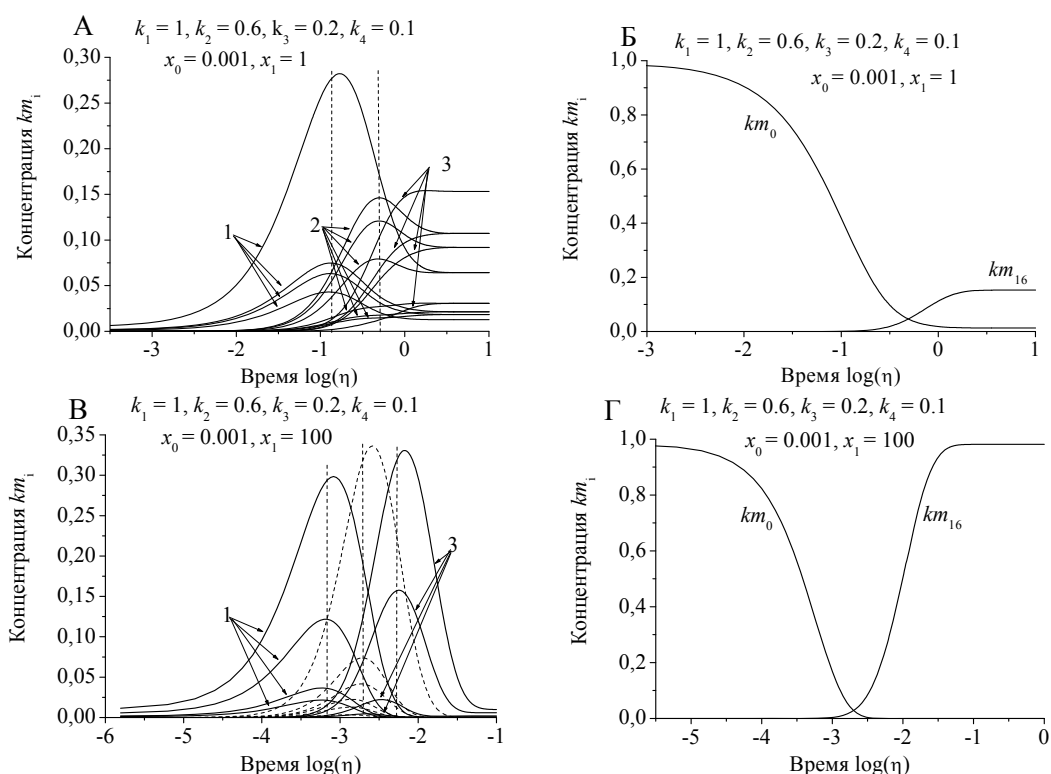


Рис. 4.4. Динамика изменения концентрации молекулярных форм  $km_i$  при скачке концентрации лиганда (А, Б) от  $x = 0,001$  до  $x = 1$ , (В, Г) от  $x = 0,001$  до  $x = 100$ . Во всех случаях  $k_1 = 1, k_2 = 0.6, k_3 = 0.2, k_4 = 0.1, k_1^- = k_2^- = k_3^- = k_4^- = 1$ . На рис. 1 и в цифрой 1 помечены молекулярные моды с одним связанным лигандом, цифрой 3 — с тремя. Пунктирными линиями помечены молекулярные моды с двумя связанными лигандами

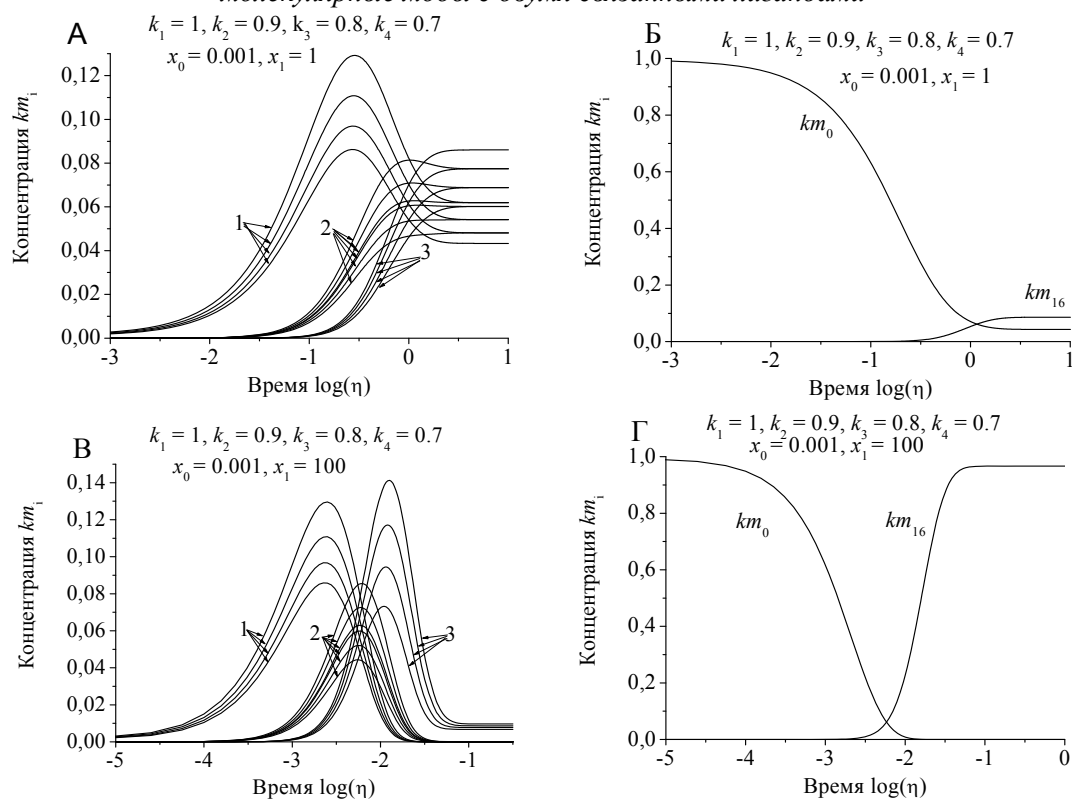


Рис. 4.5. Динамика изменения концентрации молекулярных форм  $km_i$  при скачке концентрации лиганда (А, Б) от  $x = 0,001$  до  $x = 1$ , (В, Г) от  $x = 0,001$  до  $x = 100$ . Во всех случаях  $k_1 = 1, k_2 = 0.9, k_3 = 0.8, k_4 = 0.7, k_1^- = k_2^- = k_3^- = k_4^- = 1$

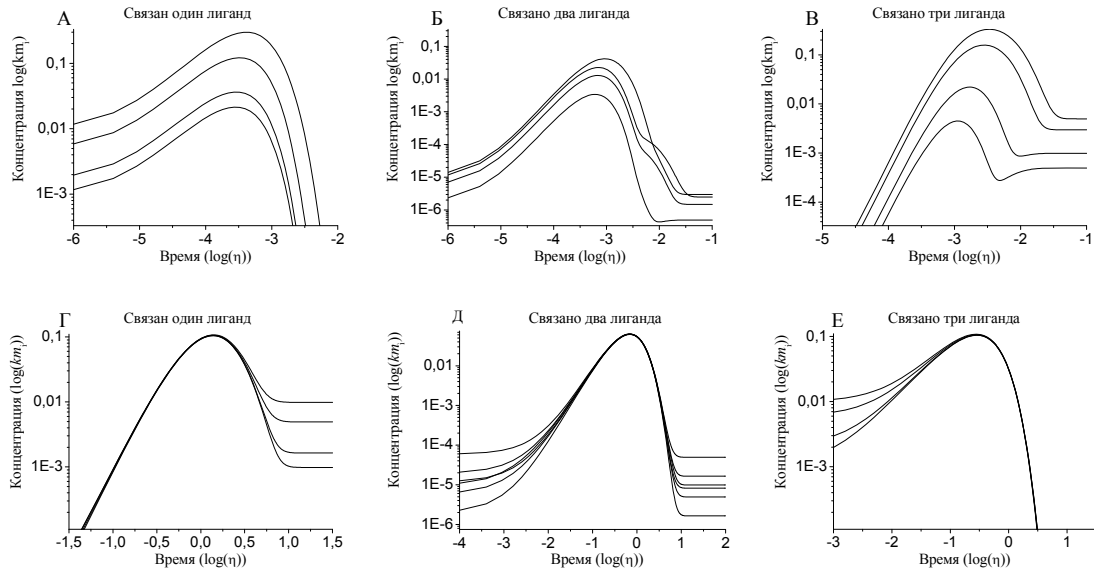


Рис. 4.6. Динамика изменения концентрации молекулярных форм  $kt_i$  при скачке концентрации лиганда от  $x = 0,001$  до  $x = 100$ , (A, Б, В), от  $x = 100$  до  $x = 0.001$  (Г,Д,Е).. А, Г — связан один лиганд, Б, Д связано два лиганда, В, Е — связано три лиганда. Во всех случаях  $k_1 = 1$ ,  $k_1 = 0.6$ ,  $k_1 = 0.2$ ,  $k_1 = 0.1$ ,  $k_1^- = k_2^- = k_3^- = k_4^- = 1$ ,  $\eta = k_1^- \cdot t$

Максимальные амплитуды молекулярных мод пропорциональны произведению равновесных констант диссоциации центров не занятых лигандом. Например, амплитуда молекулярной моды, у которой занят четвертый центр будет равна  $\alpha \cdot KM0 \cdot k_1 \cdot k_2 \cdot k_3$ , а амплитуда молекулярной формы, у которой занят первый центр будет  $\alpha \cdot KM0 \cdot k_2 \cdot k_3 \cdot k_4$ . В нашем случае  $\alpha = 2.18$ . Амплитуды молекулярных мод, связавших по три лиганда, будут пропорциональны равновесной константе диссоциации свободного от лиганда центра. Например, свободен 4 центр, то амплитуда будет  $\beta \cdot KM0 \cdot k_4$ , а если свободен первый  $\beta \cdot KM0 \cdot k_1$ . В нашем случае  $\beta = 0.24$ .



В этом случае асинхронность достижения максимумов наиболее сильно проявляется для динамики изменения концентрации  $km_i$ , связавших три лиганда при скачке концентрации лиганда от  $x = 0,001$  до  $x = 100$ . Когда константы ско-

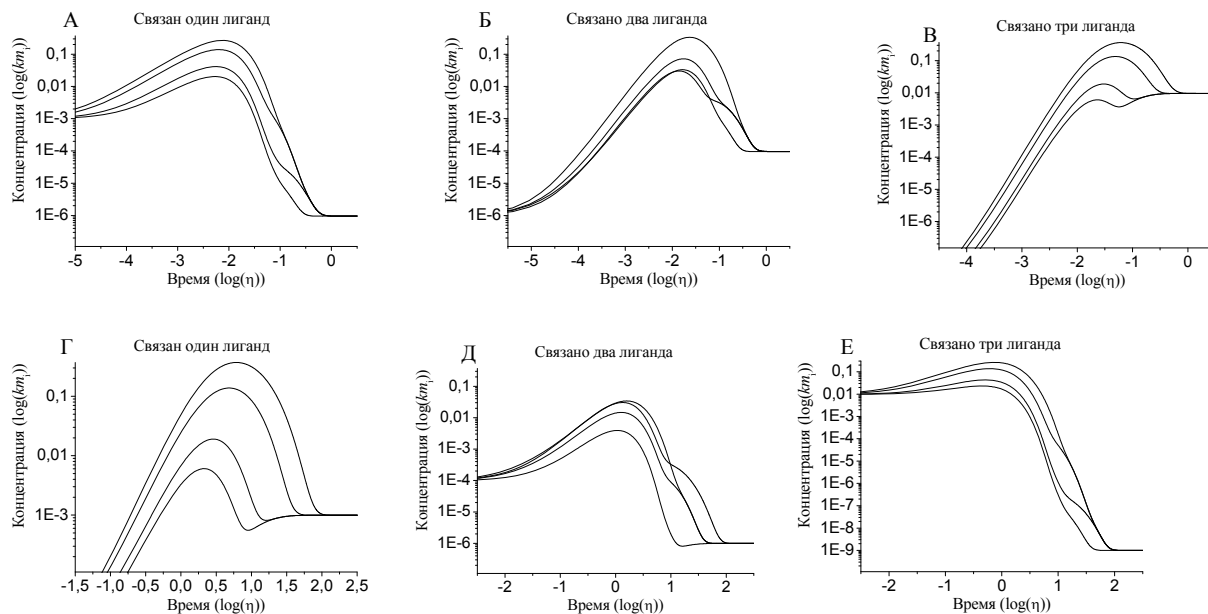


Рис. 4.7. Динамика изменения концентрации молекулярных форм  $km_i$  при скачке концентрации лиганда от  $x = 0,001$  до  $x = 100$ , (А, Б, В), от  $x = 100$  до  $x = 0.001$  (Г, Д, Е). А, Г — связан один лиганд, Б, Д связано два лиганда, В, Е — связано три лиганда. Во всех случаях  $k_1 = 1$ ,  $k_1 = 1$ ,  $k_1 = 1$ ,  $k_1 = 1$ ,  $k_1^- = 1$ ,  $k_2^- = 0.6$ ,  $k_3^- = 0.2$ ,  $k_4^- = 0.1$ ,  $\eta = k_1^- \cdot t$

рости распада все одинаковы, при скачке концентрации лиганда от  $x = 100$  до  $x = 0.001$  положение максимумов и амплитуды молекулярных форм, связавших одинаковое количество лигандов, будет близко друг к другу.

## 5. Попарная кооперативность между центрами связывания

Кооперативность между центрами связывания приводит к тому, что равновесная константа диссоциации одного центра зависит от того, связал или нет лиганд предшествующий кооперативный центр. Рассмотрение молекулы с 4 центрами связывания. Пусть у нее первый центр со вторым, а 3 с 4 кооперативно связаны. Тогда при рассмотрении стационара необходимо знать следующие равновесные константы диссоциации  $K_1, K_2, K_2^k, K_3, K_4, K_4^k$ , где  $K_2^k, K_4^k$  — значения равновесных констант диссоциации после связывания лиганда первым и треть-

им центром связывания соответственно. В этом случае мы не можем использовать формулы, которые были получены ранее.

Вероятность того, что первый центр занят  $p_1^1$  или свободен  $p_1^0$  будет

$$\begin{aligned} p_1^0 &= \frac{k_1}{k_1 + x}, \\ p_1^1 &= \frac{x}{k_1 + x}. \end{aligned} \quad (5.1)$$

Для второго центра пусть  $p_2^{00}$  вероятность того, что первый центр свободен и второй тоже свободен,  $p_2^{01}$  — вероятность того, что первый центр свободен, а второй занят лигандом,  $p_2^{10}$  — вероятность того, что первый центр занят, а второй свободен,  $p_2^{11}$  — вероятность того, что оба центра заняты лигандами.

$$\begin{aligned} p_2^{00} &= \frac{k_1}{k_1 + x} \cdot \frac{k_2}{k_2 + x}, p_2^{10} = \frac{x}{k_1 + x} \cdot \frac{k_2^k}{k_2^k + x}, \\ p_2^{01} &= \frac{k_1}{k_1 + u} \cdot \frac{x}{k_2 + x}, p_2^{11} = \frac{x}{k_1 + x} \cdot \frac{x}{k_2^k + x}. \end{aligned} \quad (5.2)$$

Для третьего центра будем иметь:

$$\begin{aligned} p_3^0 &= \frac{k_3}{k_3 + x}, \\ p_3^1 &= \frac{x}{k_3 + x}. \end{aligned} \quad (5.3)$$

Для четвертого

$$\begin{aligned} p_4^{00} &= \frac{k_1}{k_1 + x} \cdot \frac{k_2}{k_2 + x}, p_4^{10} = \frac{x}{k_1 + x} \cdot \frac{k_2^k}{k_2^k + x}, \\ p_4^{01} &= \frac{k_1}{k_1 + x} \cdot \frac{x}{k_2 + x}, p_4^{11} = \frac{x}{k_1 + x} \cdot \frac{x}{k_2^k + x}. \end{aligned} \quad (5.4)$$

где  $x = u/K_1$ ,  $k_i = K_i/K_1$ ,  $k_i^k = K_i^k / K_1$ .

Имея выражения для этих вероятностей, мы можем записать формулы для зависимости концентрации молекулярных форм  $km_i$  от концентрации лиганда.

$$km_i = p_2^{j_1, j_2} \cdot p_4^{j_3, j_4} S, \quad (5.5)$$

где  $j_i = 0$ , если  $i$  центр свободен,  $j_i = 1$ , если  $i$  центр занят лигандом.

На рис. 5.1 приведены зависимости концентрации  $km_i$  от концентрации лиганда А — кооперативности между центрами связывания нет, Б — при присоединении лиганда к первому центру, у второго центра  $k_2$  изменяется от 0.9 до 0.2, а у четвертого центра при связывании лиганда третьим центром  $k_4$  изменяется от 0.8 до 0.1.

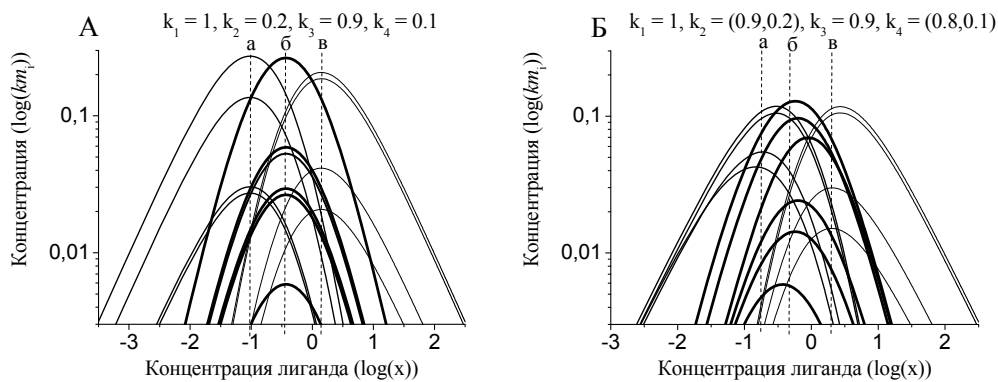


Рис. 5.1. Стационарная зависимость концентрации  $km_i$  от концентрации лиганда. А) — кооперативности между центрами связывания нет. Б) 1 центр со 2, 3 с 4 кооперативно связаны. Когда происходит связывание лиганда 1 центром, равновесная константа диссоциации второго центра изменяется от 0.9 до 0.2, а когда происходит связывание лиганда 3 центром равновесная константа диссоциации четвертого центра изменяется от 0.8 до 0.1

На рис. 5.1А видно, что при отсутствии кооперативности положение максимумов молекулярных мод, связавших по одинаковому количеству лигандов, имеют очень близкие значения на оси концентрации лиганда. Когда между центрами связывания есть кооперативность, положение максимумов у молекулярных мод, связавших одинаковое количество лигандов, сильно различается.

Сравним, как будет связывать лиганд наша молекула при наличии кооперативности и без нее. Без кооперативности молекула будет связывать лиганд следующим образом:

$$Ls(x) = L0 \cdot \sum_{i=1}^n \frac{x}{k_i + x}. \quad (5.6)$$

При наличии попарно кооперативных центров молекула будет связывать лиганд:

$$Ls^k(x) = L0 \cdot \left( \frac{x^2 \cdot (k_2 - k_2^k)}{(k_1 + x) \cdot (k_2 + x) \cdot (k_2^k + x)} + \frac{x^2 \cdot (k_4 - k_4^k)}{(k_3 + x) \cdot (k_4 + x) \cdot (k_4^k + x)} + \sum_{i=1}^n \frac{x}{k_i + x} \right). \quad (5.7)$$

На рис. 5.2 представлена стационарная зависимость количества связанного мо-

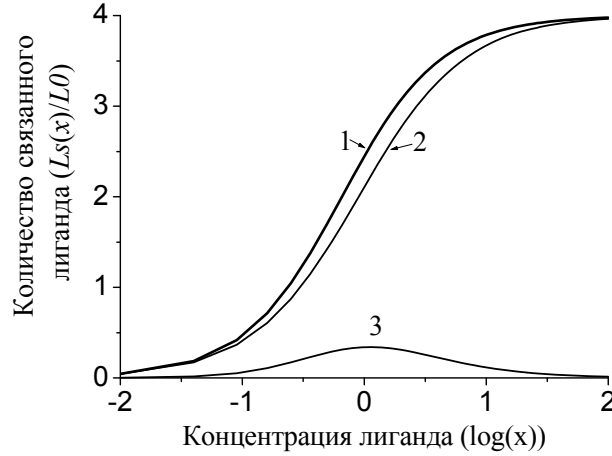


Рис. 5.2. Зависимость количества лиганда, связанного молекулой  $Ls(x)/L0$  от концентрации лиганда  $x = u/K_1$  при наличии кооперативности — (1), и при ее отсутствии — (2). Для кривой (1)

$k_1 = 1, k_2 = 0.9, k_3 = 0.9, k_4 = 0.8$ . Для кривой (2)  $k_1 = 1, k_2 = 0.9, k_2^k = 0.2,$

$k_3 = 0.9, k_4 = 0.8, k_4^k = 0.1$ . Кривая (3) показывает кооперативную добавку  $(Ls^k(x) - Ls(x))/L0$

лекулой лиганда от концентрации лиганда в случае, когда есть попарно кооперативная связь центров связывания (1) и, когда ее нет (2).

Рассмотрим молекулу с 4 одинаковыми центрами связывания  $K$ , у которой после связывания лиганда любым центром равновесная константа диссоциации остальных центров изменяется и становится  $K^k$  (абсолютная кооперативность). В этом случае количество связанного лиганда будет описываться формулами  $Ls(x)$  без кооперативности и  $Ls^k(x)$  с кооперативностью:

$$Ls(x) = L0 \cdot \frac{4 \cdot x}{1 + x},$$

$$Ls^k(x) = L0 \cdot \left( \frac{4 \cdot x}{(1 + x) \cdot (k^k + x)^3} + \frac{12 \cdot x^2}{(k^k + x)^4} + \frac{12 \cdot x^3}{(k^k + x)^4} + \frac{4 \cdot x^4}{(k^k + x)^4} \right), \quad (5.8)$$

где  $x = u / K, k^k = K^k / K$ .

На рис. 5.3 представлена стационарная зависимость количества связанного молекулой лиганда от концентрации лиганда в случае, есть абсолютная кооперативность между центрами связывания. В этом случае связывание лиганда

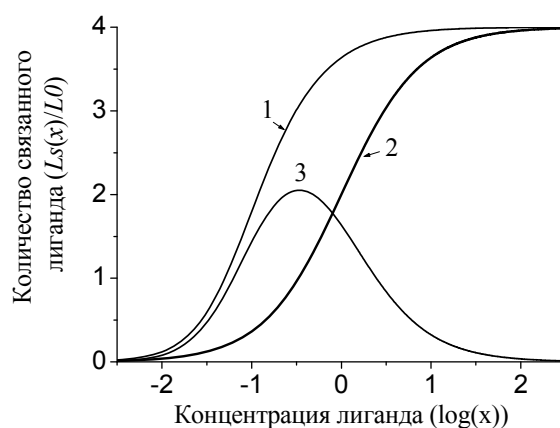


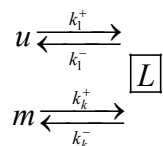
Рис. 5.3. Зависимость количества лиганда, связанного молекулой  $Ls(x)/L0$  от концентрации лиганда  $x = u/K$  при наличии абсолютной кооперативности — (1), и при ее отсутствии — (2). Для кривой (2)  $k^k = 0.1$ . Кривая (3) показывает кооперативную добавку  $(Ls^k(x) - Ls(x)) / L0$

любым центром приводит к изменению равновесной константы диссоциации у всех остальных центров.

## 6. Присутствие конкурирующего лиганда

При взаимодействии лиганда с молекулой в растворе может присутствовать другой лиганд, который тоже взаимодействует с центрами связывания молекулы, но эти взаимодействия не приводят к физиологическим последствиям (фермент не становится активным, канал не открывается). Например, с центрами связывания кальция у белка кальмодулина может связываться магний. Образование комплекса кальмодулина с магнием не приводит к физиологическим изменениям конформации кальмодулина.

Рассмотрим молекулу ( $L$ ) с одним центром связывания. Пусть взаимодействие происходит по схеме:



В растворе есть лиганд ( $u$ ), который связывается с этим центром с константами: скорости ассоциации  $k^+$  и константа скорости диссоциации  $k^-$ , а конкурирующий лиганд ( $m$ ) с  $k_k^+$  и  $k_k^-$ .

Дифференциальные уравнения, которые будут описывать процесс связывания лиганда и конкурента можно записать в следующем виде:

$$\begin{aligned}
 \frac{d[L]}{dt} &= -k^+ \cdot [u] \cdot [L] - k_k^+ \cdot [m] \cdot [L] + k^- \cdot [Lu] + k_k^- \cdot [Lm], \\
 \frac{d[Lu]}{dt} &= k^+ \cdot [u] \cdot [L] - k^- \cdot [Lu], \\
 \frac{d[Lm]}{dt} &= k_k^+ \cdot [m] \cdot [L] - k_k^- \cdot [Lm], \\
 [L] + [Lu] + [Lm] &= [L0].
 \end{aligned}
 \tag{6.1}$$

Стационарное решение этой системы уравнений будет:

$$\begin{aligned}
 L &= L0 \cdot \frac{K}{K \cdot \left(1 + \frac{m}{K_k}\right) + u}, \\
 Lu &= L0 \cdot \frac{u}{K \cdot \left(1 + \frac{m}{K_k}\right) + u}, \\
 Lm &= L0 \cdot \frac{m \cdot \frac{K}{K_k}}{K \cdot \left(1 + \frac{m}{K_k}\right) + u},
 \end{aligned}
 \tag{6.2}$$

где  $K = \frac{k^-}{k^+}$ ,  $K_k = \frac{k_k^-}{k_k^+}$ .

Выражения для этих концентраций можно представить как произведения общего количества молекул на вероятность того, занят центр соответствующим лигандом или свободен :

$$\begin{aligned}
 L &= L0 \cdot p^{00}, \\
 Lu &= L0 \cdot p^{10}, \\
 Lm &= L0 \cdot p^{01},
 \end{aligned}
 \tag{6.3}$$

где  $p^{00}, p^{10}, p^{01}$  вероятности того, что центр связывания свободен, занят  $u$  и занят  $m$  соответственно. Тогда для любого центра молекулы с  $n$  независимыми центрами можно записать:

$$\begin{aligned}
p_i^{00} &= \frac{K_i}{K_i \cdot \left(1 + \frac{m}{K_k}\right) + u}, \\
p_i^{10} &= \frac{u}{K_i \cdot \left(1 + \frac{m}{K_k}\right) + u}, \\
p_i^{01} &= \frac{m \cdot \frac{K_i}{K_k}}{K_i \cdot \left(1 + \frac{m}{K_k}\right) + u}.
\end{aligned} \tag{6.4}$$

Рассмотрим молекулу с  $n$  независимыми центрами связывания, когда есть основной (вызывающий физиологический эффект) и конкурирующий лиганд.

В этом случае есть два возможных варианта 1) когда при связывании лиганда конкурента, молекула сохраняет физиологическую активность 2) когда при связывании лиганда конкурента, молекула становится физиологически неактивна.

Рассмотри эти варианты по отдельности.

1. Физиологическая активность определяется только лигандом  $u$ .

В этом случае вероятность того, что центр свободен или занят конкурирующим лигандом  $m$  будет  $p_i^0 = p_i^{00} + p_i^{01}$ . Вероятность того, что центр занят лигандом  $u$  будет  $p_i^1 = p_i^{10}$ . Введем в наших формулах псевдоравновесные константы диссоциации

$$K_i^p = K_i \cdot \left(1 + \frac{m}{K_k}\right). \tag{6.5}$$

Тогда

$$\begin{aligned}
p_i^0 &= \frac{K_i^p}{K_i^p + u}, \\
p_i^1 &= \frac{u}{K_i^p + u}.
\end{aligned} \tag{6.6}$$

При такой замене становится справедливым все, что было нами получено ранее для связывания лиганда без конкурирующей молекулы. В этом случае происходит сдвиг положения максимумов по оси концентрации лиганда. На рис. 6.1 представлена зависимость концентрации  $km_i$  молекулы с 4 одинаковыми центрами связывания лигандов от концентрации лиганда при разных концентрациях конкурирующего лиганда. Толстой линией помечены кривые при  $m/K^k = 0$ ,  $K = 1$ , тонкой линией при  $m/K^k = 4$ ,  $K = 1$ .

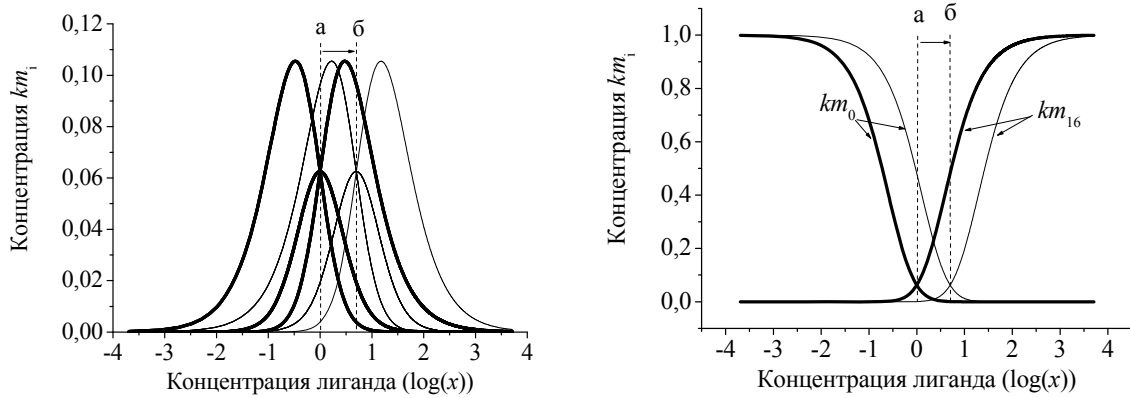


Рис. 6.1. Зависимость концентрации  $km_i$  молекулы с 4 одинаковыми центрами связывания лигандов от концентрации лиганда при разных концентрациях конкурирующего лиганда  $m$ . Толстой линией помечены кривые при  $m/K^k = 0$ ,  $K = 1$ , тонкой линией при  $m/K^k = 4$ ,  $K = 1$

В этом случае значения концентраций лиганда, при которых  $km_i$  достигают своих максимальных значений, будет:

$$u_i^{\max} = \frac{K \cdot \left(1 + \frac{m}{K^k}\right) \cdot i}{n - i}, \quad i = 1, 2, \dots, n - 1. \quad (6.7)$$

Значения концентрации лиганда, при которой молекулярные моды без связанных лигандов и с  $n$  связанными лигандами, будут достигать полумаксимальной концентрации:

$$u_0^{0.5} = K \cdot \left(1 + \frac{m}{K^k}\right) \cdot \frac{1 - \sqrt[n]{0.5}}{\sqrt[n]{0.5}},$$

$$u_n^{0.5} = K \cdot \left(1 + \frac{m}{K^k}\right) \cdot \frac{\sqrt[n]{0.5}}{1 - \sqrt[n]{0.5}}. \quad (6.8)$$



Рассмотрим второй вариант, когда при связывании конкурирующего лиганда молекула становится физиологически неактивна. На рис. 6.2 приведена зависимость концентрации  $km_i$  молекулы с 4 одинаковыми центрами связывания лигандов от концентрации лиганда при разных концентрациях конкурирующего лиганда  $m$ .

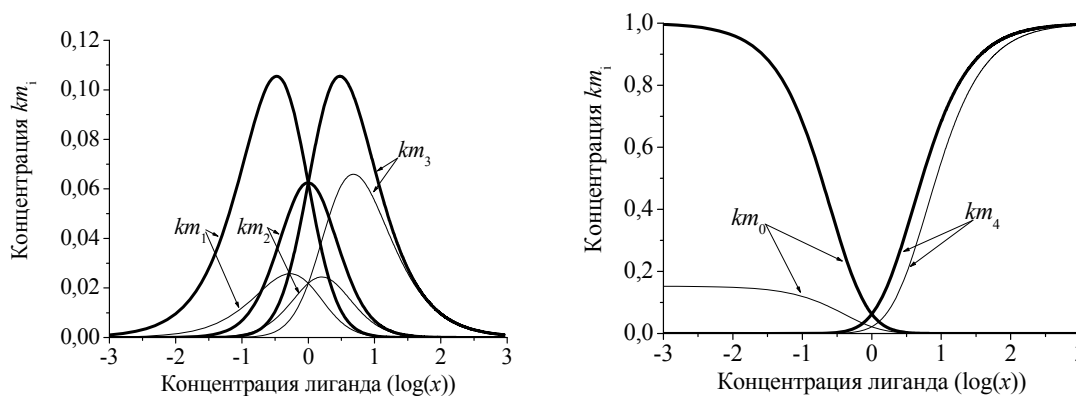


Рис. 6.2. Зависимость концентрации  $km_i$  молекулы с 4 одинаковыми центрами связывания лигандов от концентрации лиганда при разных концентрациях конкурирующего лиганда  $m$ . Толстой линией помечены кривые при  $m/K^k = 0$ ,  $K = 1$ , тонкой линией при  $m/K^k = 0.6$ ,  $K = 1$

ющего лиганда  $m$ . Толстой линией помечены кривые при  $m/K^k = 0$ ,  $K = 1$ , тонкой линией при  $m/K^k = 0.6$ ,  $K = 1$ .

В этом случае значения концентраций лиганда  $u$ , при которых  $km_i$  достигают максимальных значений, будет таким же, как и в первом случае:

$$u_i^{\max} = \frac{K \cdot \left(1 + \frac{m}{K^k}\right) \cdot i}{n - i}, \quad i = 1, 2, \dots, n-1. \quad (6.9)$$

Значения концентрации лиганда, при которой молекулярные моды без связанных лигандов и с  $n$  связанными лигандами, будут достигать полумаксимальной концентрации будет таким же, как и в первом случае:

$$u_0^{0.5} = K \cdot \left(1 + \frac{m}{K^k}\right) \cdot \frac{1 - \sqrt[n]{0.5}}{\sqrt[n]{0.5}}, \quad (6.10)$$

$$u_n^{0.5} = K \cdot \left(1 + \frac{m}{K^k}\right) \cdot \frac{\sqrt[n]{0.5}}{1 - \sqrt[n]{0.5}}.$$

Амплитуды максимальных значений концентраций  $km_i$  при  $i = 0, 1, \dots, n-1$  будут:

$$km_i^{\max} = \frac{i^i}{n^n} \cdot \left( \frac{(n-i)}{\left(1 + \frac{m}{K^k}\right)} \right)^{n-i}. \quad (6.11)$$

Сравнивая выражение (6.11) с (2.8) можно видеть, что амплитуда  $i$  молекулярной моды при добавлении конкурирующего лиганда в концентрации  $m$  уменьшается в  $\left(1 + \frac{m}{K^k}\right)^{n-i}$  раз  $i = 0, 1, \dots, n$ .

В случае, который представлен на рис. 6.2 ( $m/K^k = 0.6$ ,  $n = 4$ ) амплитуды при добавлении конкурирующего лиганда уменьшились соответственно:  $km_0$  в 6.554 раз,  $km_1$  в 4.096 раз,  $km_2$  в 2.56 раз,  $km_3$  в 1.6 раз,  $km_4$  в 1 раз.

## 7. Вариант, когда сохраняется только общая концентрация лиганда

Рассмотрим вариант, когда у молекулы один центр связывания. Пусть  $L0$  общая концентрация связывающей молекулы,  $uL$  — концентрация молекул, связавших лиганд,  $L$  — концентрация свободных молекул,  $U0$  общая концентрация лиганда,  $k^+$  — константа скорости ассоциации,  $k^-$  — константа скорости диссоциации. В этом случае система уравнений (1.3) должна быть дополнена уравнением сохранения общей концентрации лиганда.

$$\begin{aligned} \frac{dL(u,t)}{dt} &= -k^+ \cdot L(u,t) \cdot u(t) + k^- \cdot uL(u,t), \\ \frac{duL(u,t)}{dt} &= k^+ \cdot L(u,t) \cdot u(t) - k^- \cdot uL(u,t), \\ L(u,t) + uL(u,t) &= L0, \\ u(t) + uL(u,t) &= U0. \end{aligned} \quad (7.1)$$

Решая эту систему уравнений при скачке общей концентрации лиганда от  $U0_0$  к  $U0_1$ , получим:

$$\begin{aligned}
uL(u,t) &= L0 \cdot \left( p(U0_0) + (p(U0_1) - p(U0_0)) \cdot \tanh\left(\frac{t}{\tau}\right) \right), \\
L(u,t) &= L0 \cdot \left( 1 - p(U0_0) - (p(U0_1) - p(U0_0)) \cdot \tanh\left(\frac{t}{\tau}\right) \right), \\
u(t) &= U0_1 \cdot \left( 1 - \left( p(U0_0) + (p(U0_1) - p(U0_0)) \cdot \tanh\left(\frac{t}{\tau}\right) \right) \right), \\
p(U0_0) &= \frac{K}{2 \cdot L0} \cdot \left( \frac{L0}{K} + \frac{U0_0}{K} + 1 - \left( \left( \frac{L0}{K} - \frac{U0_0}{K} \right)^2 + 2 \cdot \left( \frac{L0}{K} + \frac{U0_0}{K} \right) + 1 \right)^{0.5} \right), \\
p(U0_1) &= \frac{K}{2 \cdot L0} \cdot \left( \frac{L0}{K} + \frac{U0_1}{K} + 1 - \left( \left( \frac{L0}{K} - \frac{U0_1}{K} \right)^2 + 2 \cdot \left( \frac{L0}{K} + \frac{U0_1}{K} \right) + 1 \right)^{0.5} \right), \\
\tau &= \frac{1}{2 \cdot k^- \cdot \left( \left( \frac{L0}{K} - \frac{U0_1}{K} \right)^2 + 2 \cdot \left( \frac{L0}{K} + \frac{U0_1}{K} \right) + 1 \right)^{0.5}}, \tag{7.2}
\end{aligned}$$

где  $K = k^- / k^+$ ,  $\tanh(x) = \frac{\exp(x) - \exp(-x)}{\exp(x) + \exp(-x)}$ .

На рис. 7.1 представлена зависимость концентрации лиганда  $u(t)$  и концентрации молекул, связавших лиганд  $uL(t)$ , от времени  $\eta = k^- \cdot t$  при скачке общей концентрации лиганда от  $U0_0/K = 0.001$  к  $U0_1/K = 1$ .  $L0/K = 1$ . У молекулы L один центр связывания лиганда.

При общей концентрации молекул  $L0$  общая концентрация независимых центров связывания будет равна  $n \cdot L0$ . Для молекулы, у которой  $n$  независимых центров связывания можно записать выражения для концентрации всех  $M$  молекулярных форм и свободной концентрации лиганда при скачке общей концентрации лиганда  $U0_0$  к  $U0_1$ .

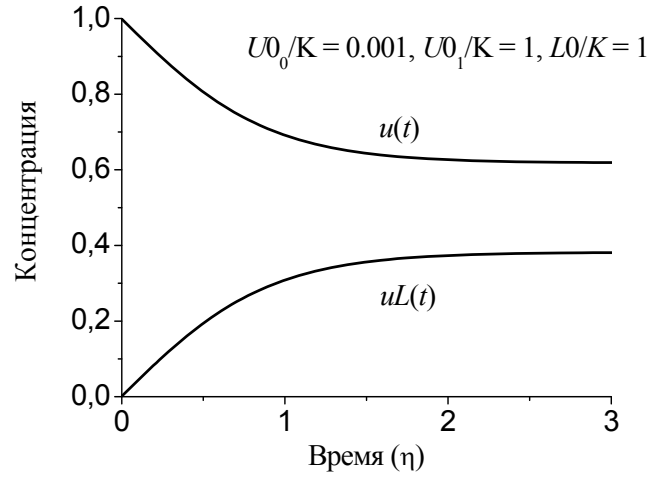


Рис. 7.1. Зависимость концентрации лиганда  $u(t)$  и концентрации молекул, связавших лиганд  $uL(t)$ , от времени  $\eta = k^- \cdot t$  при скачке общей концентрации лиганда от  $U0_0/K = 0.001$  к  $U0_1/K = 1$ .  $L0/K = 1$ . У молекулы  $L$  один центр связывания лиганда

$$L^{(j)}(U0, t) = L0 \cdot \prod_{i=1}^n p_i^{k_i}(U0, t),$$

$k_i = 1$ , если центр занят лигандом,  $k_i = 0$ , если центр свободен,

$$u(t) = U0_1 - L0 \cdot \sum_M i \cdot \prod_{i=1}^n p_i^{k_i}(U0, t) = U0_1 - L0 \cdot \sum_{i=1}^n p_i^1(U0, t),$$

$$p_i^1(U0, t) = \left( p_i(U0_0) + (p_i(U0_1) - p_i(U0_0)) \cdot \tanh\left(\frac{t}{\tau_i}\right) \right),$$

$$p_i^0(U0, t) = \left( 1 - p_i(U0_0) - (p_i(U0_1) - p_i(U0_0)) \cdot \tanh\left(\frac{t}{\tau_i}\right) \right),$$

$$p_i(U0_0) = \frac{K_i}{2 \cdot L0 \cdot n} \cdot \left( \frac{L0 \cdot n}{K_i} + \frac{U0_0}{K_i} + 1 - \left( \left( \frac{L0 \cdot n}{K_i} - \frac{U0_0}{K_i} \right)^2 + 2 \cdot \left( \frac{L0 \cdot n}{K_i} + \frac{U0_0}{K_i} \right) + 1 \right)^{0.5} \right),$$

$$p_i(U0_1) = \frac{K_i}{2 \cdot L0 \cdot n} \cdot \left( \frac{L0 \cdot n}{K_i} + \frac{U0_1}{K_i} + 1 - \left( \left( \frac{L0 \cdot n}{K_i} - \frac{U0_1}{K_i} \right)^2 + 2 \cdot \left( \frac{L0 \cdot n}{K_i} + \frac{U0_1}{K_i} \right) + 1 \right)^{0.5} \right),$$

$$\tau_i = \frac{1}{2 \cdot k_i^-} \cdot \left( \left( \frac{L0 \cdot n}{K_i} - \frac{U0_1}{K_i} \right)^2 + 2 \cdot \left( \frac{L0 \cdot n}{K_i} + \frac{U0_1}{K_i} \right) + 1 \right)^{-0.5}, \quad (7.3)$$

где  $K_i = k_i^- / k_i^+$ ,  $\tanh(x) = \frac{\exp(x) - \exp(-x)}{\exp(x) + \exp(-x)}$ .

При скачке общей концентрации лиганда от  $U0_0$  к  $U0_1$  для молекулы, у которой  $n$  одинаковых независимых центров связывания, получим следующие выражения для концентрации молекулярных форм, связавших  $i$  молекул лиганда (рис. 7.2):

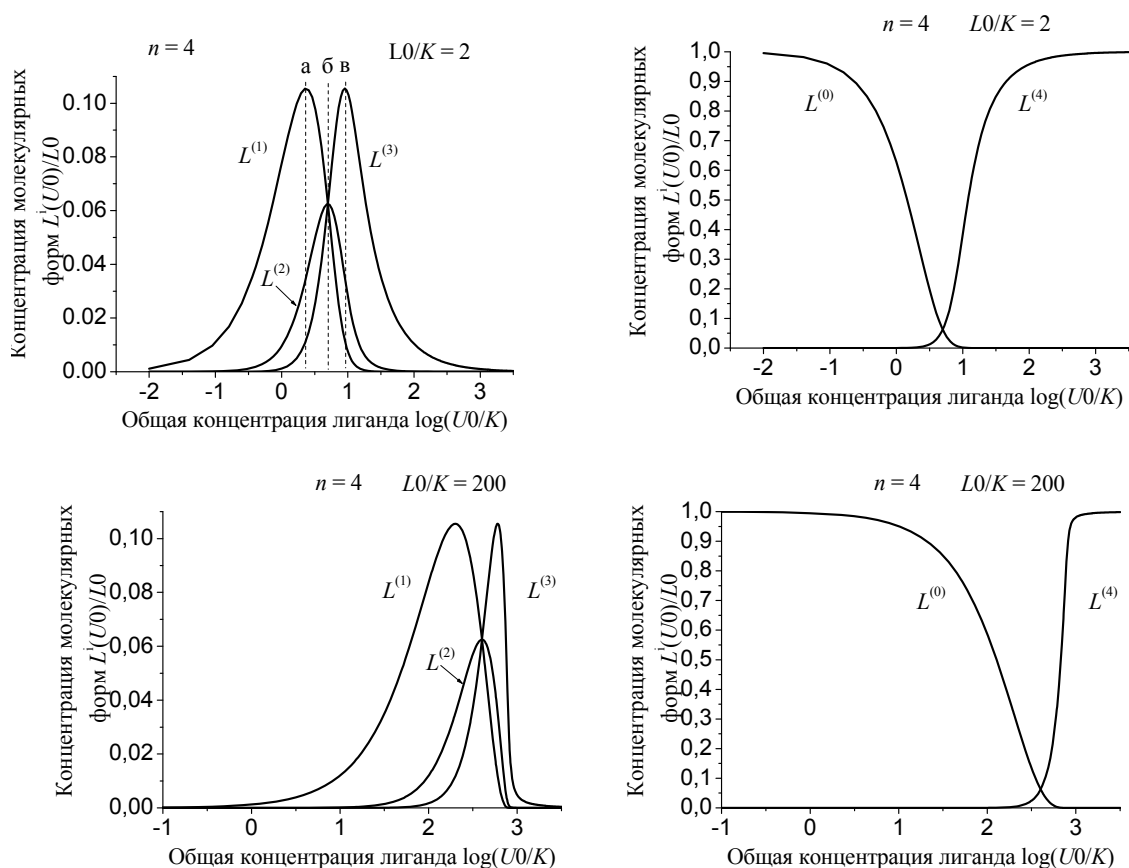


Рис. 7.2. Зависимость стационарной концентрации молекулярных форм молекулы, имеющей 4 центра связывания, связавших  $i$  молекул лиганда  $L^{(i)}$ , от общей концентрации лиганда  $U0$  при двух разных концентрациях  $L$  молекул  $L0/K = 2$  и  $L0/K = 200$

$$L^{(i)}(U0,t) = L0 \cdot (p^1(U0,t))^i \cdot (p^0(U0,t))^{n-i}. \quad (7.4)$$

У молекулы с  $n$  центрами связывания лиганда стационарная зависимость концентрации молекулярных форм, связавших  $i$  молекул лиганда  $L^{(i)}$ , будет:

$$L^{(i)}(U0) = L0 \cdot \left( \frac{K_i}{2 \cdot L0 \cdot n} \cdot \left( \frac{L0 \cdot n}{K_i} + \frac{U0}{K_i} + 1 - \left( \left( \frac{L0 \cdot n}{K_i} - \frac{U0}{K_i} \right)^2 + 2 \cdot \left( \frac{L0 \cdot n}{K_i} + \frac{U0}{K_i} \right) + 1 \right)^{0.5} \right) \right)^i \cdot \left( \frac{K_i}{2 \cdot L0 \cdot n} \cdot \left( \frac{L0 \cdot n}{K_i} - \frac{U0}{K_i} - 1 + \left( \left( \frac{L0 \cdot n}{K_i} - \frac{U0}{K_i} \right)^2 + 2 \cdot \left( \frac{L0 \cdot n}{K_i} + \frac{U0}{K_i} \right) + 1 \right)^{0.5} \right) \right)^{n-i} \quad (7.5)$$

(рис. 7.3).

Значения общей концентрации лиганда, при которой молекулярные моды будут иметь максимальные значения, получим из уравнений (7.5), взяв производную по  $U0$  и приравняв, полученное выражение нулю, получим:

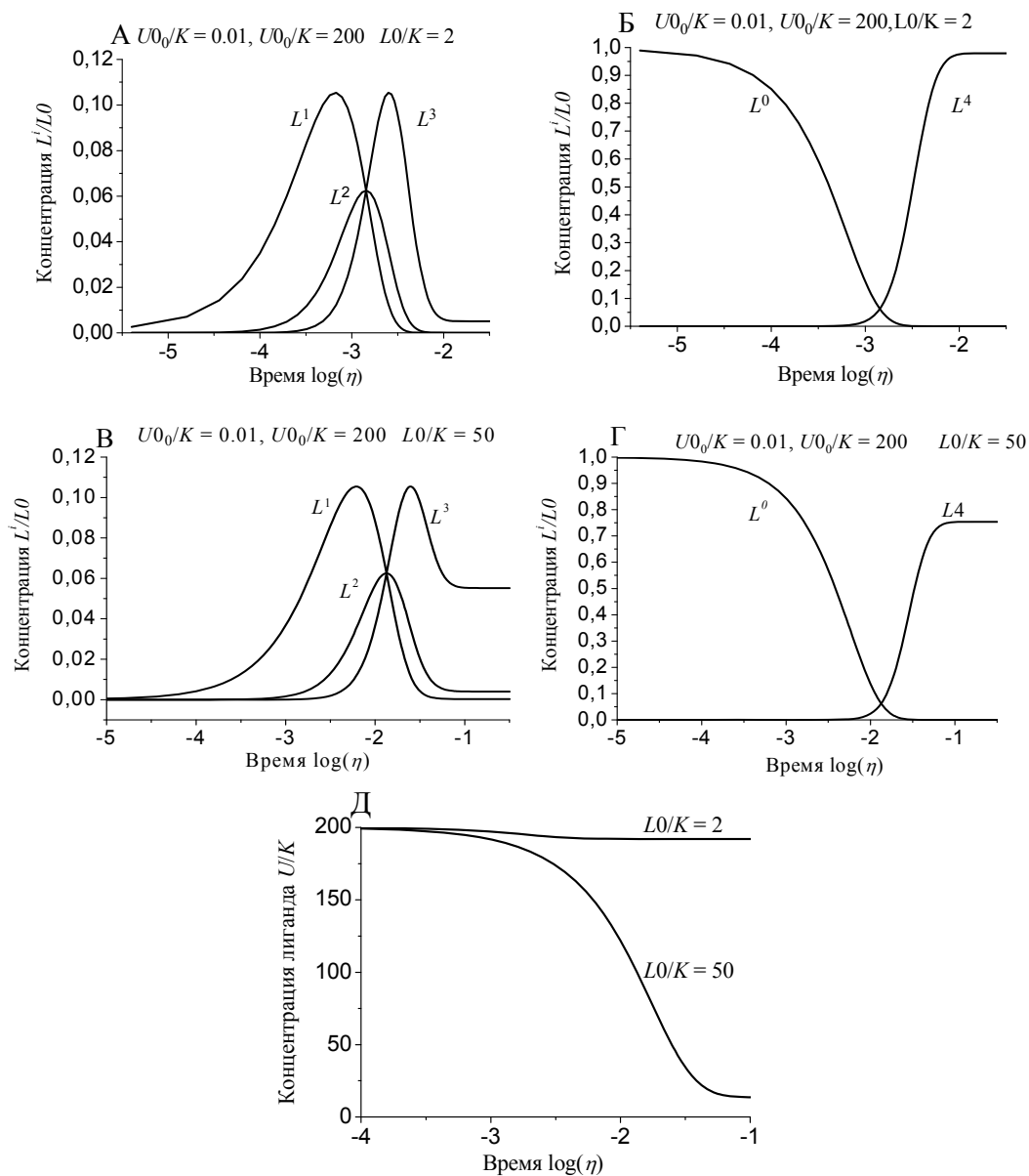


Рис. 7.3. Зависимость концентрации молекулярных мод  $L^{(i)}$  и концентрации свободного лиганда  $U$  от времени  $\eta = k^{-1} \cdot t$  при скачке общей концентрации лиганда от  $U0_0/K = 0.01$  к от  $U0_1/K = 200$  при двух значениях концентрации молекул  $L$  (А, Б)  $L0/K = 2$ , (В, Г)  $L0/K = 50$ . Д – зависимость концентрации свободного лиганда  $U$  от времени

$$U0_i^{max} = i \cdot \left( L0 + \frac{K}{n-i} \right) \quad (7.6)$$

При этих концентрациях амплитуды молекулярных мод будут:

$$L^{(i)}(U0_i^{max}) = L0 \cdot \frac{i^i}{n^n} \cdot (n-i)^{n-i} \quad (7.7)$$

Полумаксимальные значения амплитуд молекулярной моды без связанных молекул лиганда и молекулярной моды, связавшей  $n$  молекул лиганда, будут при концентрации лиганда  $U0_0^{0.5}$ ,  $U0_n^{0.5}$ :

$$\begin{aligned} U0_0^{0.5} &= \left(1 - 0.5^{\frac{1}{n}}\right) \cdot \left(L0 \cdot n + \frac{K}{0.5^{\frac{1}{n}}}\right), \\ U0_n^{0.5} &= 0.5^{\frac{1}{n}} \cdot \left(L0 \cdot n + \frac{K}{1 - 0.5^{\frac{1}{n}}}\right). \end{aligned} \quad (7.8)$$

Динамика изменения концентрации молекулярных форм при скачке общей концентрации лиганда от  $U0_0$  к  $U0_1$  представлена на рис. 7.3. Максимальные значения концентраций молекулярных мод, связавших  $i$  молекул лиганда  $L^{(i)}$ , время полуспада концентрации молекулярной формы без связанных молекул лиганда  $L^{(0)}$  и время достижения полумаксимальной концентрации молекулярной формы с  $n$  молекулами лиганда  $L^{(n)}$  будут соответственно при значении времени  $\tau_i^{\max}, \tau_0^{0.5}, \tau_n^{0.5}$ ,

$$\begin{aligned} \tau_i^{\max} &= \tau \cdot \operatorname{atanh} \left( \frac{i - n \cdot p(U0_0)}{n \cdot (p(U0_1) - p(U0_0))} \right), \\ \tau_n^{0.5} &= \tau \cdot \operatorname{atanh} \left( \frac{0.5^{\frac{1}{n}} \cdot p(U0_1) - p(U0_0)}{p(U0_1) - p(U0_0)} \right), \\ \tau_0^{0.5} &= \tau \cdot \operatorname{atanh} \left( \frac{1 - \left(1 - 0.5 \cdot (1 - p(U0_1))^n\right)^{\frac{1}{n}} - p(U0_0)}{p(U0_1) - p(U0_0)} \right). \\ p(U0_0) &= \frac{K}{2 \cdot L0 \cdot n} \cdot \left( \frac{L0 \cdot n}{K} + \frac{U0_0}{K} + 1 - \left( \left( \frac{L0 \cdot n}{K} - \frac{U0_0}{K} \right)^2 + 2 \cdot \left( \frac{L0 \cdot n}{K} + \frac{U0_0}{K} \right) + 1 \right)^{0.5} \right), \\ p(U0_1) &= \frac{K}{2 \cdot L0 \cdot n} \cdot \left( \frac{L0 \cdot n}{K} + \frac{U0_1}{K} + 1 - \left( \left( \frac{L0 \cdot n}{K} - \frac{U0_1}{K} \right)^2 + 2 \cdot \left( \frac{L0 \cdot n}{K} + \frac{U0_1}{K} \right) + 1 \right)^{0.5} \right), \\ \tau &= \frac{1}{2 \cdot k^-} \cdot \left( \left( \frac{L0 \cdot n}{K} - \frac{U0_1}{K} \right)^2 + 2 \cdot \left( \frac{L0 \cdot n}{K} + \frac{U0_1}{K} \right) + 1 \right)^{-0.5}. \end{aligned} \quad (7.9)$$



На рис. 7.4 представлена зависимость времени достижения максимума концентрации молекулярной формы, связавшей  $i$  молекул лиганда  $L^{(i)}$  от амплитуды ступенчатого скачка общей концентрации лиганда  $U0_1$ .

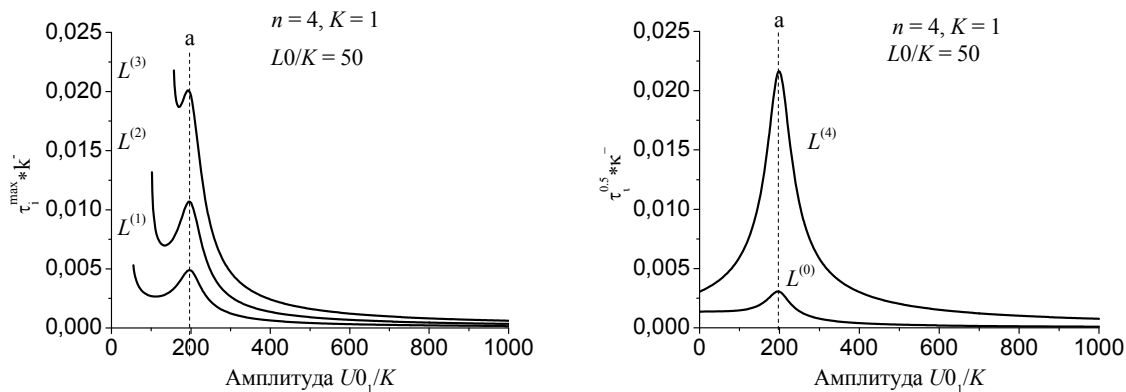


Рис. 7.4. Зависимость времени достижения максимума концентрации  $\tau_i^{\max}$  молекулярных мод, связавшей  $i$  молекул лиганда  $L^{(i)}$ , и полумаксимальной концентрации молекулярных мод без связанного лиганда и с  $n$  связанными лигандами  $\tau_i^{0.5}$  от амплитуды ступенчатого скачка общей концентрации лиганда  $U0_1$ . Концентрация молекул  $L$  равна  $L0/K = 50$

Возьмем производную по  $U0$  от выражения (7.9) и приравняем ее нулю. Оттуда получим, что кривые, представленные на рис. 7.4 имеют максимумы при амплитуде скачка общей концентрации равной (на рис. 7.4 это значение концентрации  $U0_1$  помечено пунктирной линией а):

$$U0_1^{\max} = n \cdot L0 - K. \quad (7.10)$$

Пусть значение общей концентрации лиганда равно  $U0_1 / K = 200$ . На рис. 7.5 представлена зависимость стационарной концентрации свободных молекул лиганда  $U$  от концентрации молекул  $L$  при трех значениях равновесной константы диссоциации  $K$ .

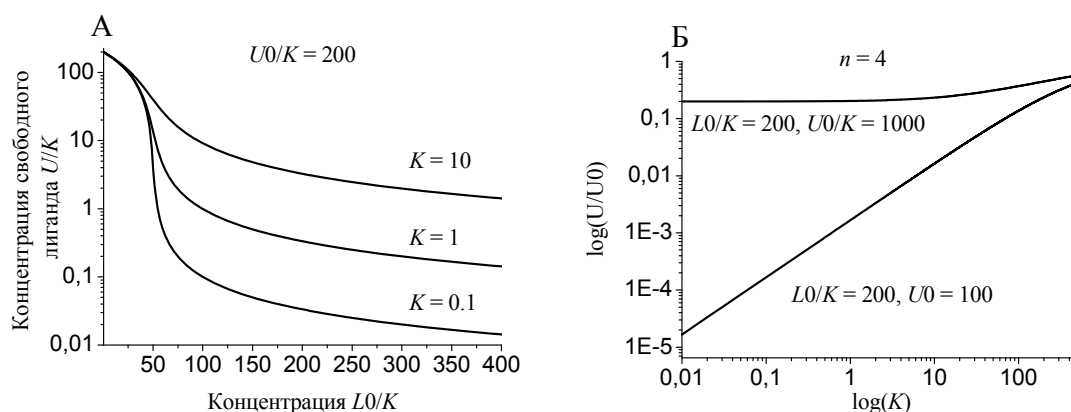


Рис. 7.5. Зависимость стационарной концентрации свободного лиганда  $U/K$  А) от концентрации молекул  $L0/K$  при трех разных значениях равновесной константы диссоциации  $K$ . Общая концентрация лиганда  $U0/K = 200$ . Б) зависимость стационарной концентрации свободного лиганда  $U/U0$  от значений равновесной константы диссоциации  $K$  при двух разных значениях общей концентрации лиганда

По рис. 7.5 видно, что при  $K \leq 1$  и близких значениях концентрации молекулы  $L$  и общей концентрации лиганда  $U0$ , лиганд находится в связанной форме.

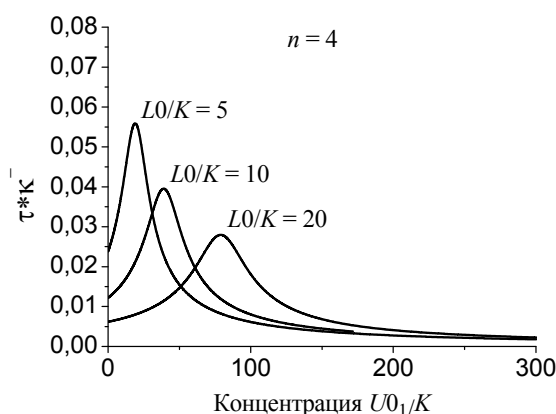


Рис. 7.6. Зависимость константы времени  $\tau$  от амплитуды скачка общей концентрации лиганда  $U0_1 / K$  при разных концентрациях молекулы  $L$

На рис. 7.6 дана зависимость константы времени  $\tau$  от амплитуды скачка общей концентрации лиганда  $U0_1$ . С увеличением амплитуды эта константа растет, а затем падает.

Возьмем производную по  $U0_1$  от выражения для  $\tau$  в формуле (7.9) и приравняем ее нулю. Из этого выражения найдем, при какой амплитуде скачка общей концентрации, будет максимальное значение константы времени:

$$\cup 0_1 (\text{при } \tau = \tau^{\max}) = n \cdot L0 - K .$$

## 8. Управление молекулой с $n$ независимыми центрами связывания лиганда активностью различных белков

Молекулы с несколькими центрами связывания лиганда управляют активностью ферментов, ионных каналов или каких либо других элементов клетки. Такое управление может быть реализовано несколькими механизмами. 1. Управляющая молекула ( $L$ ) образует с управляемой молекулой ( $N$ ) комплекс только тогда, когда с ней связаны лиганды по строго определенным центрам связывания ( $L_i$ ). Когда образуется комплекс, все центры связывания лиганда с управляющей молекулой изменяют константы скорости ассоциации и диссоциации. После этого происходит изменение активности фермента, проводимости ионного канала и т. п. Когда же у управляющей молекулы изменяется количество связанных лигандов, происходит изменение констант скорости ассоциации и диссоциации реакции комплексообразования управляющей молекулы с управляемой. В общем случае это управление можно представить следующей схемой (рис. 8.1):

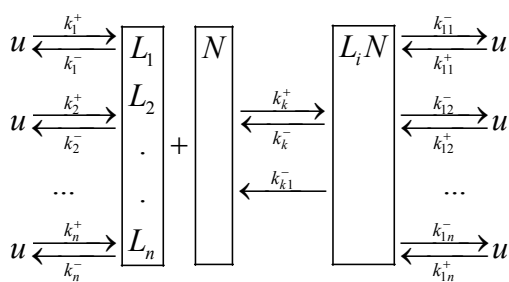


Рис. 8.1. Схема управления молекулой с  $n$  центрами связывания лиганда  $L_i$  активностью другой молекулы  $N$

Образование комплекса управляющей молекулы с управляемой может приводить как к активации управляемой молекулы, так и к ее ингибированию.

Пусть  $N0$  — общее количество управляемых молекул,  $L0$  — общее количество управляющих молекул. Рассмотрим предельно упрощенный вариант при  $L0 \gg N0$  и, когда после образования комплекса с управляемой молекулой все центры связывания лиганда на управляющей молекуле ( $L_i$ ) блокируются. В

этом случае  $k_{i1}^+ = 0, k_{i1}^- = 0, k_{1k}^- = 0$ . Кроме того, максимальная константа времени образования комплекса лиганда с управляющей молекулой  $\max(\tau_i)$  намного меньше константа времени образования комплекса управляющей молекулы с управляемой молекулой  $\tau_k$

$$\max(\tau_i) \ll \tau_k.$$

В этом случае процесс управления будет описываться выражениями для последовательных реакций комплексообразования лиганда с управляющей молекулой и управляющей молекулой с управляемой. Стационарная концентрация управляемых молекул, связавших управляющую, будет:

$$L_i N(L_i(u)) = N0 \cdot \frac{L_i(u)}{K_k + L_i(u)} = N0 \cdot \frac{L0 \cdot \frac{u^i \cdot \prod_{j=n-j}^n K_j}{\prod_{j=1}^n (K_j + u)}}{K_k + L0 \cdot \frac{u^i \cdot \prod_{j=n-j}^n K_j}{\prod_{j=1}^n (K_j + u)}}. \quad (8.1)$$

Кинетика изменения концентрации активных молекул при скачке концентрации лиганда от  $u_0$  к  $u_1$  будет:

$$L_i N(L_i(u, t)) = N0 \cdot \left( \frac{L_i(u_1)}{K_k + L_i(u_1)} - \left( \frac{L_i(u_1)}{K_k + L_i(u_1)} - \frac{L_i(u_0)}{K_k + L_i(u_0)} \right) \right) \cdot \exp\left(-\frac{t}{\tau_k}\right), \quad (8.2)$$

$$\tau_k = \frac{1}{k_k^+ \cdot L_i(u_1) + k_k^-},$$

где  $K_k = k_k^- / k_k^+$ . В этом случае значения концентраций лиганда  $u^{\max}$ , при которых молекулярные формы  $N$  будут достигать максимальных (при активации) и минимальных (при ингибировании) значений, найдем из выражения:

$$L_i N(L_i(u))'_u = N0 \cdot \frac{K_k}{(K_k + L_i(u))^2} \cdot (L_i(u))'_u = 0.$$

Тогда для управляемой молекулы, которая управляется молекулой с  $n$  независимыми одинаковыми центрами связывания будет, когда с ней связано  $i$  моле-

кул лиганда, максимальная (при активации) и минимальная (при ингибировании) активность будет при концентрации лиганда:

$$u^{\max} = \frac{K \cdot i}{n - i}, \quad i = 1, 2, \dots, n - 1, \quad (8.3)$$

где  $K$  равновесная константа диссоциации реакции комплексообразования лиганда с управляющей молекулой,  $n$  = количество центров связывания,  $i$  = количество лигандов у управляющей молекулы в активной форме. При этих значениях концентрации лиганда концентрация активных управляемых молекул будет (при активации):

$$L_i N^A(L_i(u)) = N_0 \cdot \frac{1}{k_k \cdot \frac{n^n}{i^i \cdot (n-i)^{n-i}} + 1},$$

(при ингибировании):

$$L_i N^{IN}(L_i(u)) = N_0 \cdot \frac{k_k \cdot \frac{n^n}{i^i \cdot (n-i)^{n-i}}}{k_k \cdot \frac{n^n}{i^i \cdot (n-i)^{n-i}} + 1} \quad (8.4)$$

где  $k_k = K / L_0$ .

На рис. 8.2 приведена зависимость концентрации активных молекул  $N_i$  от концентрации лиганда  $x = u/K$  при различных равновесных константах диссоциации реакции комплексообразования ( $k_k$ )  $L_i$  с  $N$  в случае, когда управление

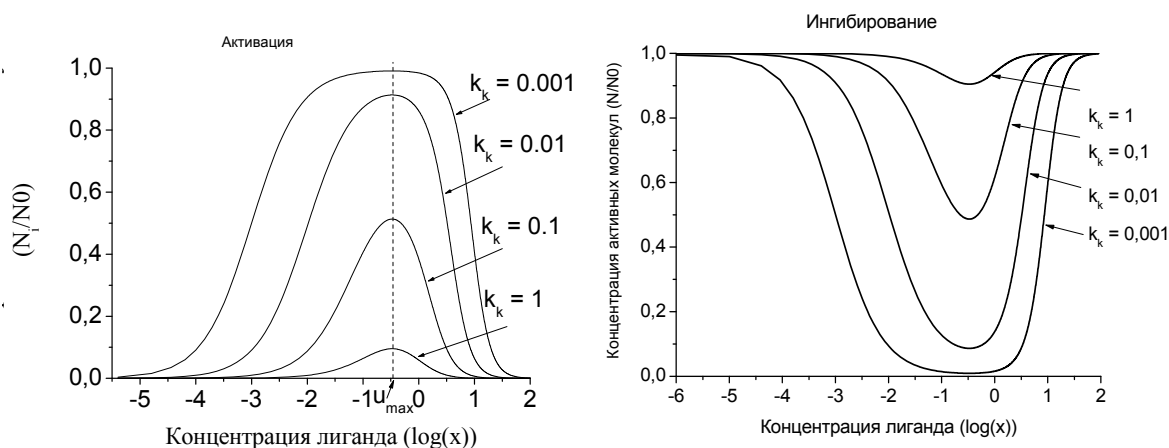


Рис. 8.2. Зависимость концентрации активных молекул  $N_i$  от концентрации лиганда  $x = u/K$  при различных равновесных константах диссоциации реакции комплексообразования  $L_i$  с  $N$  ( $k_k$ ) в случае, когда управление происходит молекулярной формой с одним связанным лигандом молекулой с 4 центрами связывания.  $k_k = K_k / L_0$

происходит молекулярной формой с одним связанным лигандом молекулой с 4 центрами связывания.

При управлении насыщенной формой с  $n$  лигандами и формой с 0 лигандов, значение концентрации лиганда, при которой будет достигаться полумаксимальная активность, будет:

$$u_n^{0.5} = K \cdot \frac{1}{\left(2 + \frac{1}{k_k}\right)^{\frac{1}{n}} - 1},$$

$$u_0^{0.5} = K \cdot \left[ \left(2 + \frac{1}{k_k}\right)^{\frac{1}{n}} - 1 \right],$$
(8.5)

где  $k_k = K / L_0$

На рис. 8.3 дана зависимость концентрации активных молекул  $N_i$  от концентрации лиганда  $x = u/K$  при различных равновесных константах диссоциации реакции комплексообразования  $L_i$  с  $N$  ( $k_k$ ) в случае, когда управление происходит молекулярной формой с 0 связанными лигандами (тонкие линии) и с

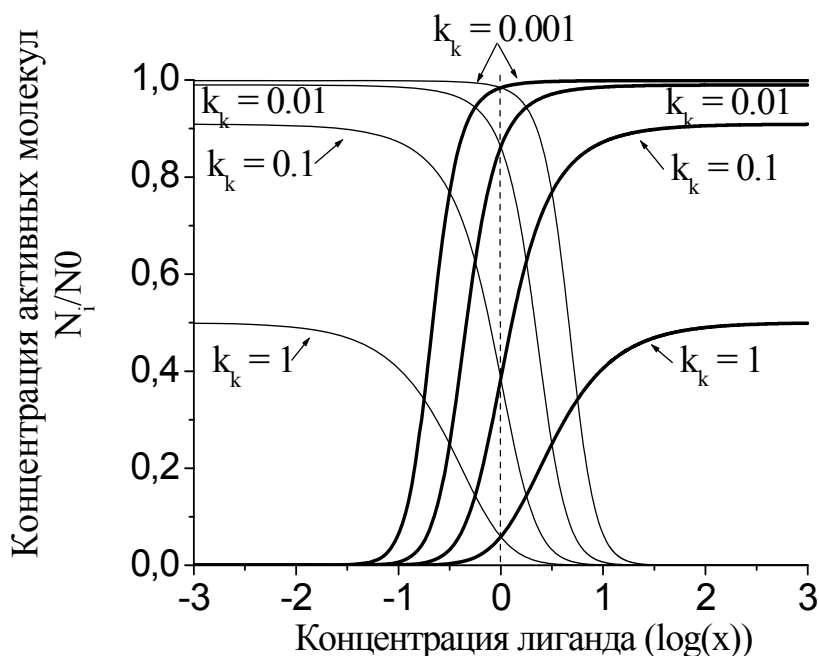


Рис. 8.3. Зависимость концентрации активных молекул  $N_i$  от концентрации лиганда  $x = u/K$  при различных равновесных константах диссоциации реакции комплексообразования  $L_i$  с  $N$  ( $k_k$ ) в случае, когда управление происходит молекулярной формой с 0 связанными лигандами (тонкие линии) и с связанными лигандами (жирные линии) молекулой с 4 центрами связывания.  $k_k = K_k / L_0$

исходит молекулярной формой с 0 и  $n$  связанными лигандами молекулой с 4 центрами связывания.  $k_k = K_k / L0$ .

Рассмотрим вариант, когда управляющая молекула непосредственно связана с управляемой молекулой (рис. 8.4). Пусть молекула переходит из пассив-

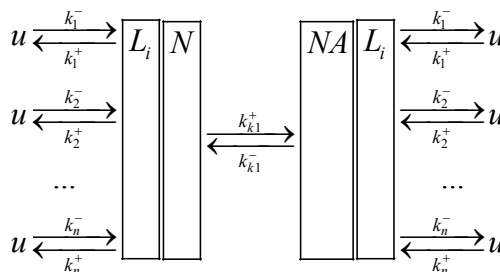


Рис. 8.4. Схема, когда управляющая молекула связана с управляемой

ного состояния в активное с определенными значениями констант скоростей. Но после того, как с конкретными центрами свяжутся лиганды, у молекулы мгновенно изменяются константы скоростей перехода в активное состояние. В этом случае переходы между активным состоянием и пассивным будет задаваться 4 константами скоростей в начальном состоянии ( $k_{k0}^-$ ,  $k_{k0}^+$ ) ( $\text{с}^{-1}$ ), после связывания определенными центрами лигандов ( $k_{k1}^-$ ,  $k_{k1}^+$ ) ( $\text{с}^{-1}$ ). Для простоты рассмотрим случай, когда у молекулы изначально очень мала вероятность перехода в активное состояние ( $k_{k0}^- \gg k_{k0}^+$ ), и этой вероятностью можно пренебречь. Вероятность того, что молекула находится в активном состоянии  $p_a$ , будет:

$$p_a = \frac{k_{k1}^+}{k_{k1}^+ + k_{k1}^-} . \quad (8.6)$$

Тогда для доли концентрации молекул, находящихся в активном состоянии можно записать:

$$L^{(j)} = p_a \cdot L0 \cdot \prod_{i=1}^n p_i^{k_i} . \quad (8.7)$$

В этом случае все, что было получено ранее для молекулы с  $n$  центрами связывания лиганда: стационары, кинетика, положения максимумов, амплиту-

ды, полумаксимальные значения, влияние конкурента, будет справедливо для молекулы с таким управлением с учетом множителя  $p_a$  для амплитуд.

Рассмотрим вариант, когда управляемая молекула активируется только после того, как с управляющей молекулой свяжется определенное количество лигандов и эти лиганды блокируются в активном состоянии управляемой молекулой (рис. 8.5).

В этом случае появляется особое состояние  $NA$ , в котором нет обмена лигандами между молекулами  $NA$  и внешней средой (ловушка). Динамику перехода  $w$  молекулярной формы в активное состояние можно представить следующим выражением:

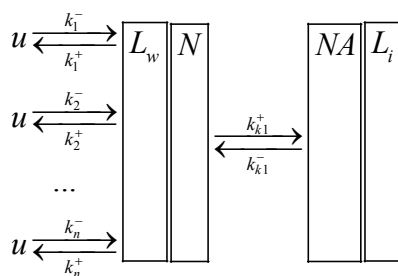


Рис. 8.5. Схема управления, когда после перехода в активное состояние происходит блокировка центров связывания управляющей молекулы

$$\frac{du_w N^0}{dt} = k_{k1}^+ \cdot u_w N - k_{k1}^- \cdot u_w N^0. \quad (8.8)$$

Стационарная концентрация активных молекул будет:

$$u_w N^0 = \frac{u_w N}{K_k}, \quad (8.9)$$

где  $K_k = k_{k1}^-/k_{k1}^+$ . В этом случае уравнение сохранения общего количества молекул можно записать:

$$u_0 N + u_{11} N + u_{12} N + \dots + u_w N + \dots + u_n N + u_w N^0 = N^0.$$



При такой схеме стационарная концентрация активных молекул в форме  $u_w N^0$  будет:

$$u_w N^0 = N^0 \cdot \frac{u^w \cdot \prod_{j=n-w}^n K_j}{u^w \cdot \prod_{j=n-w}^n K_j + K_k \cdot \prod_{j=1}^n (K_j + u)} . \quad (8.10)$$

Рассмотрим вариант, когда молекула управляется насыщенной формой с  $n$  связанными лигандами (рис. 8.6). В этом случае концентрация активных молекул будет:

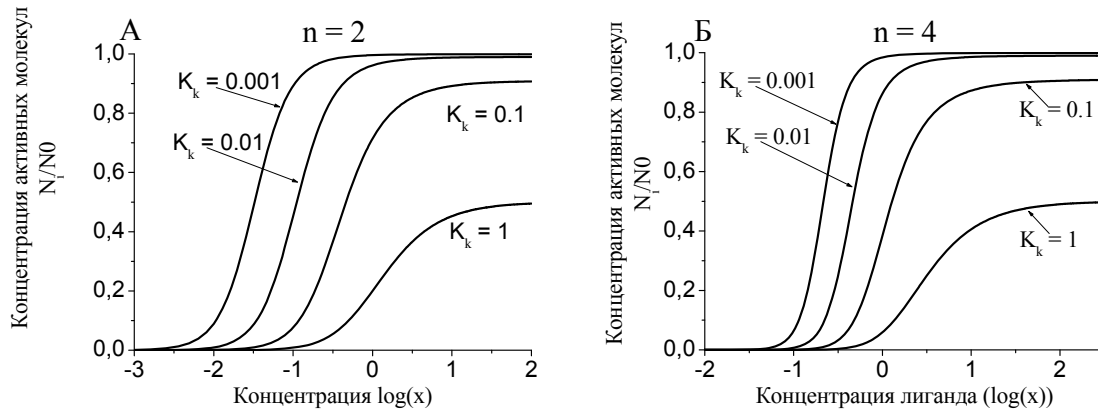


Рис. 8.6. Зависимость концентрации активных молекул  $N$ , которые управляются молекулой (рецептором) с (А) с двумя, (Б) с четырьмя центрами связывания лиганда от концентрации лиганда  $x = u/K$  при различных константах скоростей перехода в случае, когда управление происходит молекулярной формой с двумя (А) и четырьмя (Б) связанными лигандами.  $K_k = k_k^- / k_k^+$ ,  $K_j = 1$ .

$$u_n N^0 = N^0 \cdot \frac{u^n}{u^n + K_k \cdot \prod_{j=1}^n (K_j + u)} . \quad (8.11)$$

Максимальная амплитуда при  $u \rightarrow \infty$  будет

$$N_n^{\max} = N^0 \cdot \frac{1}{1 + K_k} . \quad (8.12)$$

Соответственно, значение концентрации лиганда  $u_n^{0.5}$ , при котором будет полумаксимальная амплитуда:

$$u_n^{0.5} = K \cdot \left( \left( 2 + \frac{1}{K_k} \right)^{\frac{1}{n}} - 1 \right)^{-1}. \quad (8.13)$$

На рис. 8.7 представлена зависимость концентрации лиганда  $x^{0.5} = u_n^{0.5}/K$ , при которой достигается полумаксимальное значение концентрации активных молекул от равновесной константы скорости перехода  $K_k = k^- / k^+$  (А) при разном количестве центров связывания у управляющей молекулы ( $n$ ), и (Б) от количества центров связывания при разных равновесных константах скорости перехода  $K_k = k^- / k^+$ .

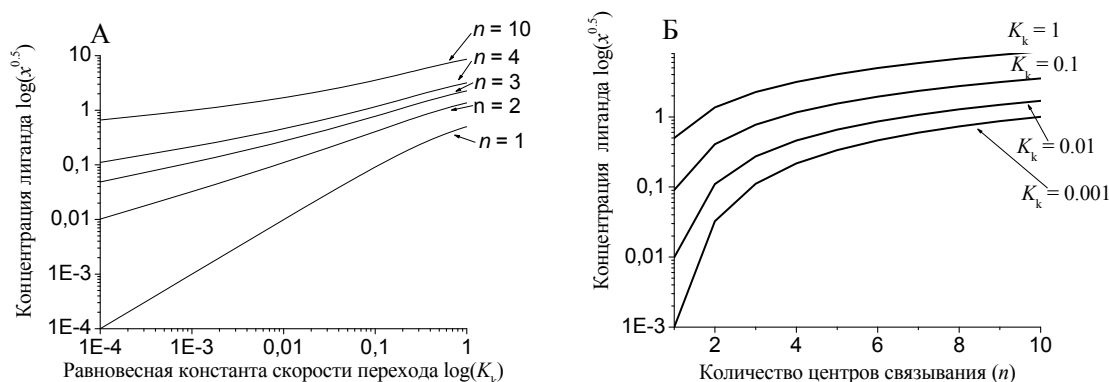


Рис. 8.7. Зависимость концентрации лиганда  $x^{0.5} = u_n^{0.5}/K$ , при которой достигается полумаксимальное значение концентрации активных молекул от равновесной константы скорости перехода  $K_k = k^- / k^+$  (А) при разном количестве центров связывания у управляющей молекулы ( $n$ ), и (Б) от количества центров связывания при разных равновесных константах скорости перехода  $K_k = k^- / k^+$

Рассмотрим вариант, когда у молекулы 4 одинаковых центра связывания лиганда с равновесной константой диссоциации  $K$ , а в активную форму переходит молекула, связавшая  $w$  молекул лиганда. В этом случае для стационарной концентрации активных молекул  $x_w N^0$  можно записать:

$$x_w N^0 = N^0 \cdot \frac{x^w}{x^w + K_k \cdot (1 + x)^4}, \quad (8.14)$$

где  $x = u/K$ .

Значения концентрации лиганда, при которых концентрации активных молекул будут достигать максимальных амплитуд, будут такими же, как и для концентрации молекул с тем же количеством связанных лигандов:

$$u_w^{\max} = \frac{K \cdot w}{n - w}, \quad w = 1, 2, \dots, n-1. \quad (8.15)$$

Значения амплитуд  $(x_w N^0)^{\max}$  будут при концентрации лиганда  $u_w^{\max}$ :

$$(x_w N^0)^{\max} = N^0 \cdot \frac{1}{K_k \cdot \left( K \cdot \frac{n}{n-w} \right)^{n-w} + 1}. \quad (8.16)$$

Связывание лиганда такой молекулой будет описываться выражением:

$$Ls(u) = N^0 \cdot \sum_{w=1}^n \frac{w \cdot \binom{w}{n} \cdot u^w \cdot \prod_{j=n-w}^n K_j}{\frac{1}{K_k} \cdot u^w \cdot \prod_{j=n-w}^n K_j + \prod_{j=1}^n (K_j + u)} + \frac{w \cdot u^w \cdot \prod_{j=n-w}^n K_j}{u^w \cdot \prod_{j=n-w}^n K_j + K_k \cdot \prod_{j=1}^n (K_j + u)}. \quad (8.17)$$

На рис. 8.8 представлены стационарные зависимости концентрации активных форм управляемой молекулы  $x_w N^0 / N^0$  от концентрации лиганда  $x = u/K$  при разных значениях  $K_k$ .

## 9. Молекула с $n$ центрами последовательного связывания лиганда

Пусть лиганд связывается с молекулой последовательно. Такое связывание можно представить схемой показанной на рис. 9.1. Лиганд связывается с

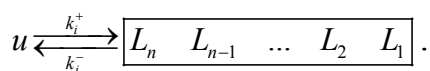


Рис. 9.1. Схема последовательного связывания лиганда молекулой

первым центром, потом со вторым, третьим и т.д. Покинуть молекулу может только последний связавшийся лиганд. Такое связывание будет описывать системой дифференциальных уравнений [1]:

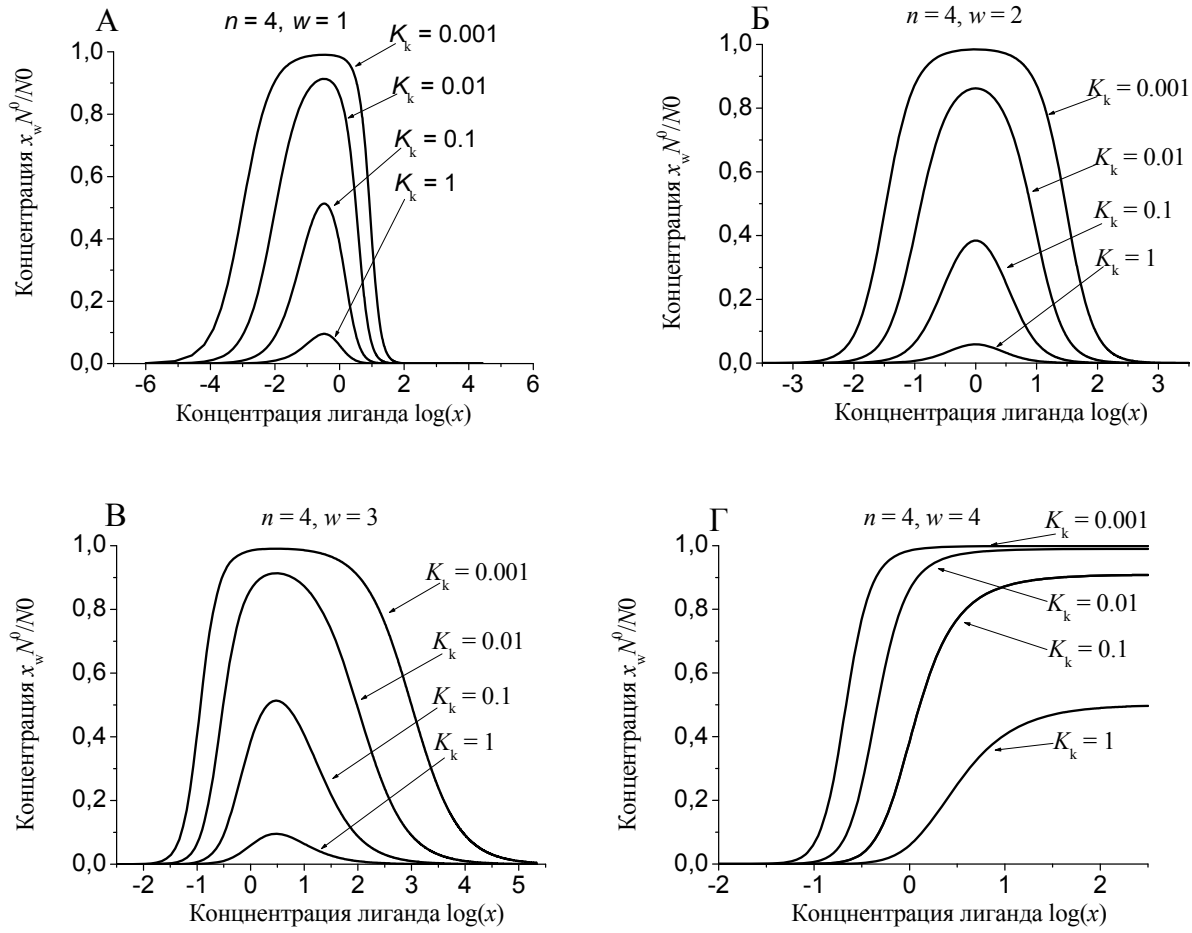


Рис. 8.8. Стационарные зависимости концентрации активных форм управляемой молекулы  $x_w N^0/N0$  от концентрации лиганда  $x = u/K$  при разных значениях  $K_k$

$$\begin{aligned}
 \frac{dL}{dt} &= -k_1^+ \cdot u \cdot L + k_1^- \cdot u L_1, \\
 \frac{duL_1}{dt} &= k_1^+ \cdot u \cdot L - k_1^- \cdot u L_1 + k_2^- \cdot u L_2 - k_2^+ \cdot u \cdot u L_1, \\
 &\dots \\
 \frac{duL_n}{dt} &= k_n^+ \cdot u \cdot L_{n-1} - k_n^- \cdot u L_n.
 \end{aligned}
 \tag{9.1}$$

Кроме того, должно выполняться условие сохранения общего количества молекул  $L0$ :

$$L + uL_1 + uL_2 + \dots + uL_n = L0.$$

Обозначим  $K_i = k_i^- / k_i^+$ . В этом случае будет  $n+1$  молекулярная форма. Стационарное решение этих уравнений будет:

$$uL_i = L0 \cdot \frac{u^i}{\left(\prod_{j=0}^i K_j\right) \cdot \sum_{i=0}^n \frac{u^i}{\prod_{j=0}^i K_j}}, \quad i = 0, 1, \dots, n; \quad K_0 = 1. \quad (9.2)$$

Рассмотрим молекулу, у которой  $n$  одинаковых центров связывания. Для этой молекулы зависимость стационарной концентрации молекулярных форм  $uL_i$  от концентрации лиганда  $u$  будет:

$$uL_i = L0 \cdot \frac{x^i}{\sum_{j=0}^n x^j}, \quad (9.3)$$

где  $x = u/K$ .

На рис. 9.2 даны зависимости концентрации молекулярных форм  $km_i = uL_i/L0$

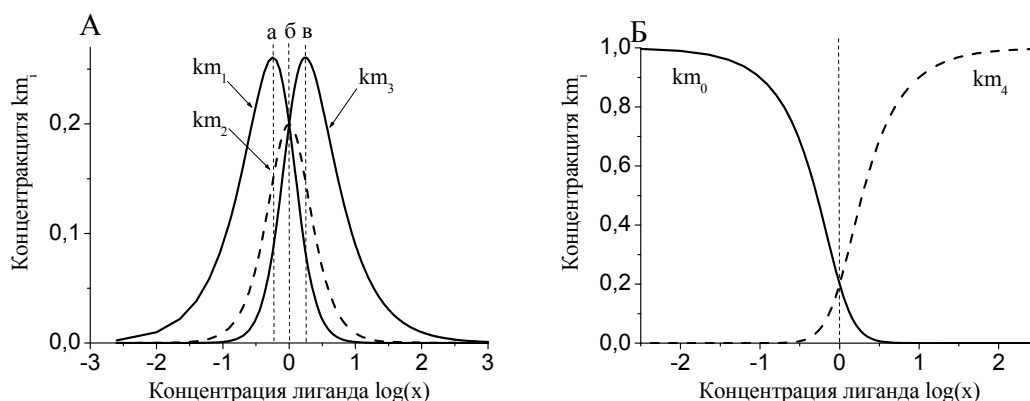


Рис. 9.2. Зависимости концентрации молекулярных форм  $km_i = uL_i/L0$  от концентрации лиганда  $x = u/K$  для молекулы, у которой 4 центра последовательного связывания

от концентрации лиганда  $x = u/K$  для молекулы, у которой 4 центра связывания. Максимальное количество связанного лиганда в этом случае будет  $Ls(u)^{\max} = n \cdot L0$ . При  $u = K$  будем иметь:

$$Ls(K) = 0.5 \cdot Ls(u)^{\max} = 0.5 \cdot n \cdot L0. \quad (9.4)$$

Концентрации, при которых молекулярные моды достигают своих максимальных значений, будут:

$$\begin{aligned} u_1^{\max} &= 0.568 \cdot K, \\ u_2^{\max} &= 1 \cdot K, \end{aligned} \quad (9.5)$$

$$u_3^{\max} = 1.761 \cdot K.$$

$$u_3^{\max} - u_1^{\max} = 1.193 \cdot K. \quad (9.6)$$

Для такой же молекулы с произвольным доступом к центрам связывания было:

$$\begin{aligned} u_1^{\max} &= 0.333 \cdot K, \\ u_2^{\max} &= 1 \cdot K, \end{aligned} \quad (9.7)$$

$$u_3^{\max} = 3 \cdot K.$$

$$u_3^{\max} - u_1^{\max} = 2.667 \cdot K. \quad (9.8)$$

При последовательном заполнении центров связывания происходит сближение значений концентраций лиганда, при которых достигаются максимальные значения.

## **10. Механизм связывания лиганда, который описывается формулой Хилла**

Традиционно принято анализировать кривые доза эффект по формулам Хилла [2].

$$L(u) = \frac{L_{\max} \cdot u^n}{K^n + u^n} \quad (10.1)$$

При этом те, кто такой анализ проводят, предполагают, что показатель формулы Хилла  $n$  имеет отношение к количеству центров связывания, а  $K$  к равновесной константе диссоциации реакции комплексообразования.

Формула Хилла является стационарным решением дифференциального уравнения:

$$\frac{d[Ln]}{dt} = (k^+ \cdot u)^n \cdot [L] - (k^-)^n \cdot [Ln], \quad (10.2)$$

$$[L] + [Ln] = [L0].$$

Это уравнение описывает некий процесс, в результате которого у нас есть толь-

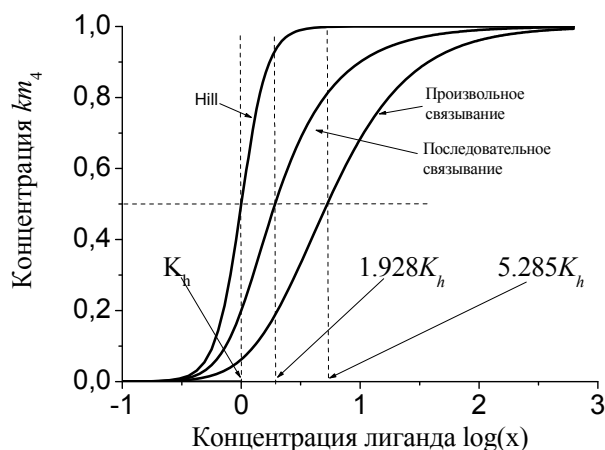


Рис. 10.1. Зависимость концентрации активных молекул с 4 одинаковыми центрами связывания, связавших 4 лиганда ( $kt_4$ ), от концентрации лиганда  $x = u/K$  для молекул с разным механизмом связывания, при последовательном и произвольном связывании

ко свободные молекулы и молекулы, связавшие  $n$  лигандов. Могут ли какие-то реальные процессы иметь такой механизм? Можно допустить, что могут. При этом, однако, нужно сказать, что те реальные механизмы, которые анализируются с помощью формулы Хилла, как правило, имеют совершенно иной (не Хилловский) механизм.

На рис. 10.1 представлены графики зависимости концентрации активных молекул фермента для трех разных механизмов связывания лиганда при одних и тех же значениях констант  $n$ ,  $K$ . Кривые для произвольного и последовательного связывания достаточно хорошо могут быть аппроксимированы формулой Хилла. Однако при этом мы получим совершенно искаженные представления о количестве центров связывания и равновесной константе диссоциации.

Анализ показывает, что  $n$ , полученное по формуле Хилла нелинейно связано с количеством центров связывания, а  $K$  сильно завышено при любом механизме связывания. На рис. 10.2 представлена зависимость коэффициентов Хилла  $n_h, k_h$

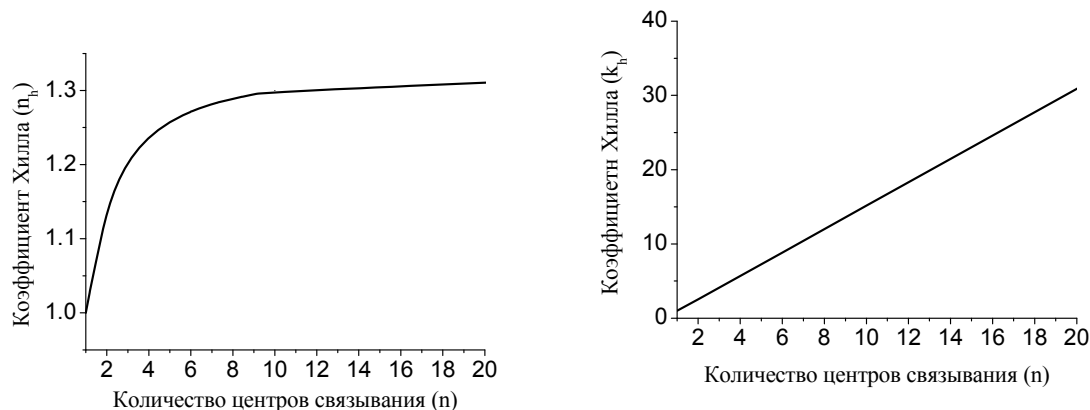


Рис. 10.2. Зависимость коэффициентов Хилла  $n_h, k_h$  от количества центров связывания  $n$  при произвольном связывании лиганда ферментом

от количества центров связывания  $n$  при произвольном связывании лиганда ферментом.

Допустим, что с помощью формулы Хилла анализируется фермент, который имеет  $n$  центров произвольного связывания лиганда и который активируется после связывания  $n$  молекул лиганда. В этом случае стационарная зависимость активности фермента от концентрации лиганда будет описываться формулой (2.6). Аппроксимируем это выражение формулой Хилла (10.1). Концентрацию лиганда нормируем  $x = \frac{u}{K_h}$ . Концентрации молекул  $L$ , связавших  $n$  молекул лиганда будет описываться формулой (2.6)

$$Ln = L0 \cdot \frac{u^n}{(K + u)^n}. \quad (10.3)$$

На рис. 10.3 представлена зависимость коэффициентов Хилла  $n_h, k_h$  от количества центров связывания  $n$  при последовательном связывании лиганда.



Возьмем значение константы Хилла в единицах  $K$ :  $k_h = K_h / K$ . С помощью

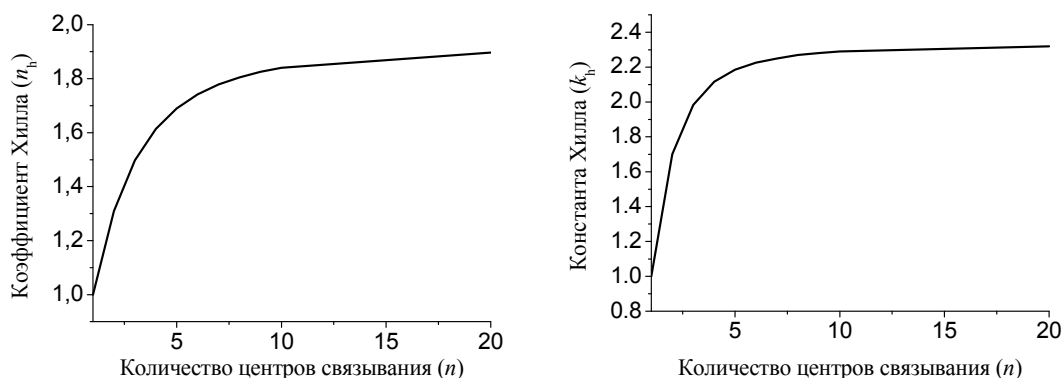


Рис. 10.3. Зависимость коэффициентов Хилла  $n_h$ ,  $k_h$  от количества центров связывания  $n$  при последовательном связывании лиганда

аппроксимации нашего выражения (10.3) формулой Хилла (10.1), найдем значение констант Хилла  $n_h, K_h$  для разных  $n$ . На рис 10.2 дан график зависимости

Таблица 10.1

Произвольный доступ лиганда

$n$	$n_h$	$k_h$
1	1	1
2	1.147	2.533
3	1.206	4.101
4	1.238	5.677
5	1.258	7.256
6	1.272	8.837
7	1.282	10.419
8	1.289	12.001
9	1.295	13.584
10	1.3	15.167

Таблица 10.2

Последовательное связывание лиганда

$n$	$n_h$	$k_h$
1	1	1
2	1.31	1.701
3	1.498	1.984
4	1.614	2.116
5	1.69	2.185
6	1.742	2.226
7	1.779	2.25
8	1.805	2.27
9	1.825	2.28
10	1.84	2.29

констант Хилла  $n_h, k_h$  от количества центров связывания  $n$  для этого случая. В этом случае зависимость реальной равновесной константы диссоциации  $K$  от констант Хилла можно представить следующим приближенным выражением:

$$K \approx \frac{K_h}{1.58 \cdot n - 0.7}. \quad (10.4)$$

В таблице 10.1 представлены данные зависимости коэффициентов Хилла от количества центров связывания фермента с произвольным доступом лиганда.

В таблице 10.2 представлены данные зависимости коэффициентов Хилла от количества центров связывания

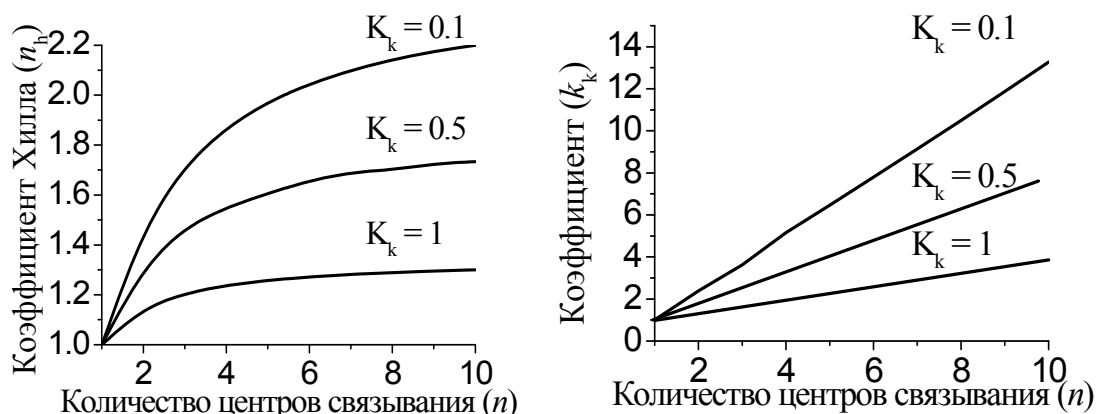


Рис. 10.4. Зависимость констант Хилла  $n_h, k_n$  от количества центров связывания  $n$  при открывании ионного канала рецептором с  $n$  центрами связывания лиганда, когда с ним связывается  $n$  молекул лиганда

при последовательном связывании лиганда. Эти коэффициенты мы вычисляли, аппроксимируя формулу:

$$Ln = L0 \cdot \frac{u^n}{1 + \sum_{i=1}^n u^i} \quad (10.5)$$

формулой Хилла (10.1).

В случае, когда молекула с  $n$  центрами связывания управляет ионным каналом, а канал открывается, когда с ней связывается  $n$  молекул лиганда, стационарная зависимость количества открытых каналов, (нормированная к единице) от концентрации лиганда будет выражаться формулой (8.11):

$$u_n N^0 = \frac{u^n \cdot (1 + K_k)}{u^n + K_k \cdot (K + u)^n}, \quad (10.6)$$

Аппроксимируя это выражение формулой Хилла, при разных значениях  $K_k$  получим следующие численные зависимости для коэффициентов Хилла (рис. 10.4):

Можно видеть, что константы Хилла являются сложными функциями от количества центров связывания и константы  $K_k$ .

## Список литературы

1. Adair J. The hemoglobin system. The oxygen dissociation curve of hemoglobin. / J. Adair // J Biol Chem. – 1925. – Т. 63 – № 2 – 529–545с.
2. Hill A The combinations of haemoglobin with oxygen and with carbon monoxide. / Hill A // J Physiol. – 1910. – № 40 – 4–7с.
3. Valeyev N. V Elucidating the mechanisms of cooperative calcium-calmodulin interactions: a structural systems biology approach. / N. V Valeyev, D. G. Bates, P. Heslop-Harrison, I. Postlethwaite, N. V Kotov // BMC Syst. Biol. – 2008. – Т. 2 – 48с.
4. Valeyev N. V Multiple calcium binding sites make calmodulin multifunctional. / N. V Valeyev, P. Heslop-Harrison, I. Postlethwaite, N. V Kotov, D. G. Bates // Mol. Biosyst. – 2008. – Т. 4 – № 1 – 66–73с.
5. Weiss J.N. The Hill equation revisited: uses and misuses. / J. N. Weiss // FASEB J. – 1997. – Т. 11 – № 11 – 835–41с.

## Задание

1. Построить математическую модель сигнальной системы, схема которой представлена на рис. 11.1:

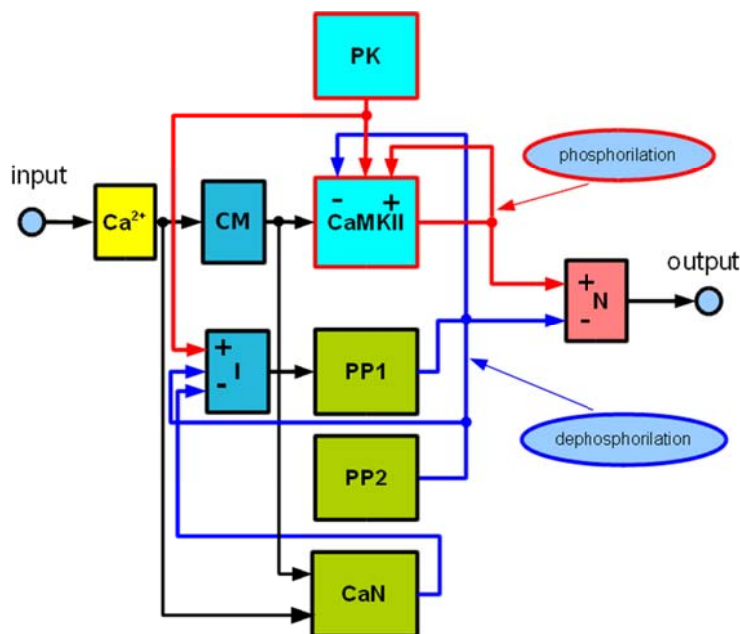


Рис. 11.1. Схема молекулярной системы. CaMKII (КП) кальций кальмодулин зависимая протеинкиназа, которая активируется кальмодулином (СМ) с 4 связанными ионами кальция. Она сама себя и белок N фосфорилирует. Фосфатаза (CaN), которая активируется СМ с 4 связанными ионами кальция (кальцинейрин), дефосфорилирует белок I (ингибитор фосфопроteinфосфатазы PP1). Кроме того, есть кальций кальмодулин независимая протеинкина (РК), которая фосфорилирует CaMKII, I, N и кальций кальмодулин независимая фосфопроteinфосфатаза (PP2), которая дефосфорилирует, CaMKII, I, N. PP1 – фосфопроteinфосфатаза, которая дефосфорилирует CaMKII и белок N. N - белок, который фосфорилируется CaMKII и РК, а дефосфорилируется PP1 и PP2

2. Построить математическую модель метаболизма циклических монофосфатов (рис. 11.2, 11.3).

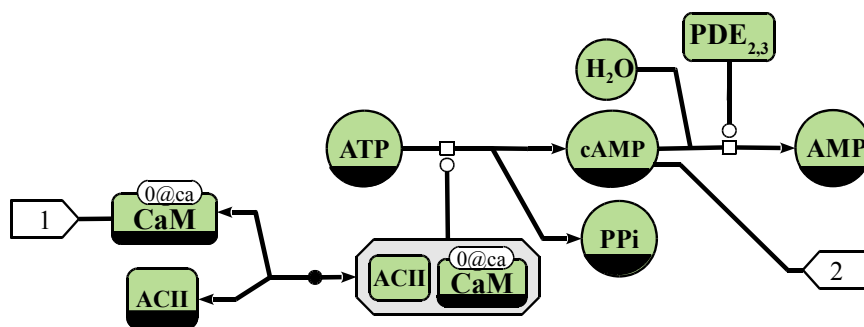


Рис. 11.2. Схема метаболизма сАМР в эритроците

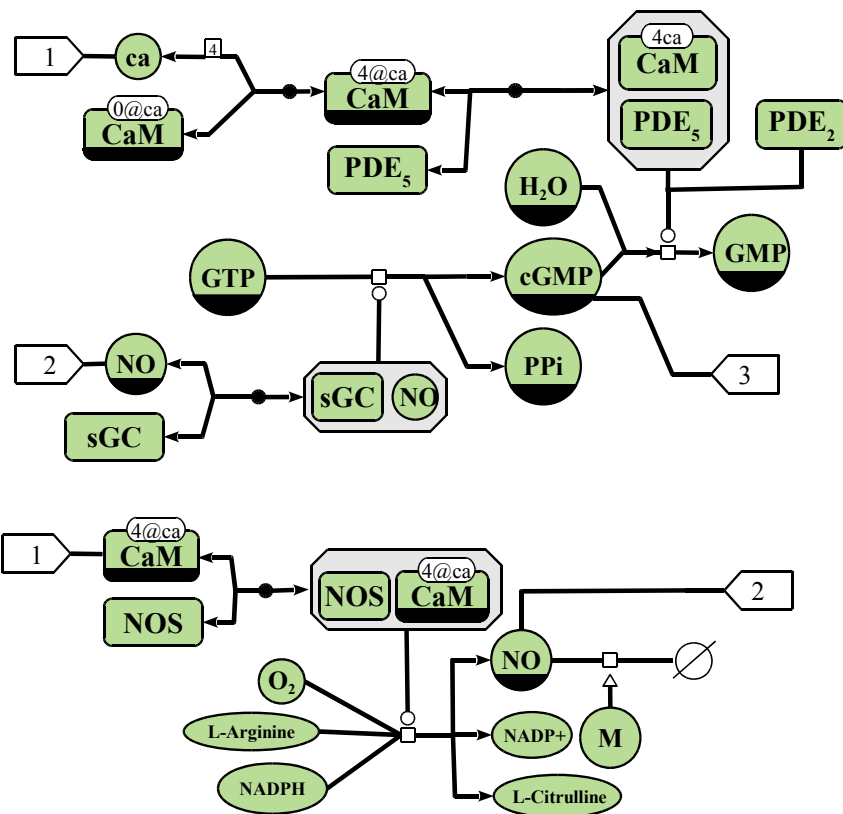


Рис. 11.3. Схема метаболизма циклического гуанозинмонофосфата сGMP и NO.

*Учебное издание*

**Евстифеев Александр Иванович  
Котов Николай Викторович**

**МОЛЕКУЛЫ С ЦЕНТРАМИ СВЯЗЫВАНИЯ ЛИГАНДА В КОНТУРАХ  
УПРАВЛЕНИЯ АКТИВНОСТЬЮ КЛЕТОЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ**

Дизайн обложки  
***М.А. Ахметов***

Подписано в печать 14.05.2015.  
Бумага офсетная. Печать цифровая.  
Формат 60х84 1/16. Гарнитура «Times New Roman». Усл. печ. л. .  
Тираж экз. Заказ

Отпечатано с готового оригинал-макета  
в типографии Издательства Казанского университета

420008, г. Казань, ул. Профессора Нужи́на, 1/37  
тел. (843) 233-73-59, 233-73-28